Elen Pereira Bastos

**Determinação do perfil de expressão de
microRNAs em câncer de mama em
mulheres jovens**

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

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Elen Pereira

Determinação do perfil de expressão de microRNAs em câncer de mama em
mulheres jovens / Elen Pereira Bastos. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Maria Mitzi Brentani.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Neoplasias da mama 3.Adulto jovem 4.Idade de
início 5.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

USP/FM/DBD-514/10

Às pessoas que tanto me apoiaram e me ergueram nos momentos difíceis: meus pais, Elza e Dilson; aos meus irmãos, Alisson e Daniel, ao meu noivo, David. Obrigado por acreditarem no meu potencial e fazerem parte dessa conquista.

À minha orientadora Profa. Dra. Mitzi Brentani pela a oportunidade e pelos ensinamentos que ficarão para vida toda.

À Dra.Dirce Carraro do Hospital Ac.Camargo por me acolher no laboratório para fazer grande parte dos experimentos.

À Dra.Maria Isabel do departamento de oncogenetica do Hospital Ac.Camargo por ter realizado as entrevista com as pacientes.

Ao Fernando Soares da anatomia-patológica do Hospital Ac.Camargo, pelas análises de imuno-histoquímica.

Ao pessoal do meu laboratório, LIN 24:Simone Crestoni, Vitor Celso, Karina Escobar, Natália Bromberg, Paulo DelValle,Yuri Urata, que me ajudaram com a adaptação no laboratório e pela amizade. Assim como as doutoras: Lucia H.Katayama, Rosimeire Roela e Tatiane Mazzoti.

À Adriana Trapé, do LIM-24 por ter me ajudado durante vários dias com a escrita da dissertação e pela amizade.

À Laura Campos, do LIM-24 por ter me ajudado com a formatação da dissertação e pela amizade.

À Dra. Fatima Pasini do LIM-24 que me ajudou muito com os ensaios de real time, e contribuiu nos resultados desse trabalho.

À s funcionárias Maria José Benevides, Rosilene Arruda, Ivonete Lima, do LIM-24-USP, que me ajudaram com todas as burocracias e datas da pós-graduação, assim como me ajudavam com os horários das reuniões com a minha orientadora uma vez que dividi meus horários com atividades no Hospital Ac.Camargo.

À s funcionárias Eloisa Olivieri, Louise Mota, Vera, do banco de macromoléculas do Hospital Ac.Camargo, pessoas queridas que tanto admiro e que me ajudaram muito com a extração de RNA e DNA, assim como informações da imuno-histoquímica.

À pós-doutoranda Tatiana I. Ricca do Hospital Ac.Camargo, que me ajudou na cultura de células e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À pós-doutoranda Mariana Masqueto do Hospital Ac. Camargo que me ajudou muito com as análises do real time e com o apoio que sempre me deu.

Ao grupo do LGBM do Hospital Ac. Camargo que realizou as análises estatísticas, principalmente à Helena Brentani e ao Cesar Torres.

À Faculdade de Medicina – USP.

À toda minha família que tiveram paciência e compreensão da minha ausência, assim como me deram muito incentivo para conquistar esse título, isso inclui: meus pais, irmãos, Luciane e minha cunhada, Maria Eugenia.

Ao meu noivo que acompanhou de perto todas as fases desse trabalho, teve paciência, tolerância, compreensão, companheirismo, e que me deu muito apoio para conquistar essa etapa e muitas que virão.

À FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro, número de processo 09/10088-7 e nº 2009/02040-4 (bolsa de mestrado).

Lista de Unidades	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Molécula de microRNA	4
1.2. Justificativa	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos Gerais	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. METODOLOGIA	11
3.1. Pacientes	12
3.2. Cultura celular	13
3.3. Extração do DNA e RNA total	14
3.4. Sequenciamento	15
3.5. RT PCR em tempo real - <i>TaqMan microRNA Assay</i>	16
3.6. Análise dos dados	18
3.7. Nomenclatura dos microRNAs	19
3.8. Confirmação <i>in silico</i>	19
3.9. Validação	20
4. RESULTADOS	22
4.1. Caracterização das pacientes e amostras	23
4.2. Caracterização das linhagens	29
4.3. Qualidade e quantidade do RNA total	29
4.4. Resultados da expressão dos miRNAs em linhagens	33
4.5. Resultados da expressão dos miRNAs em tumores	36
4.5.1. Análise estatísticas	36
4.5.2. Agrupamento hierárquico	36
4.5.3. miRNAs exclusivos/comuns entre comparações	39
4.5.4. Seleção dos miRNAs para a validação	42
4.5.5. Validação dos resultados	47

4.5.6.	Confirmação dos resultados <i>in silico</i>	50
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÃO	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8.	ANEXOS	76
9.	ADENDOS	80

LISTA DE UNIDADES

°C	graus Celsius
g	força de gravidade (aceleração centrípeta)
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nM	nanomolar
rpm	rotação por minuto
U	Unidade
μL	microlitro
μM	micromolar
=	igual a
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
≤	menor ou igual

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD34	Marcador de angiogênese
cDNA	DNA complementar
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CK	Citoqueratina
Ct	Ciclo limiar
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio Dulbecco Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (desoxi-adenosina, desoxi-citidina, desoxi-guanosina e desoxi-timidina)
DTT	Ditiotreitol
ER	Receptor de estrógeno
FDR	<i>Falso positive rate</i>
G	Guanina
GH	Grau histológico
HB4a	Linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia
HER2	Receptor do fator de crescimento humano epidermal 2
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
IDC	Carcinoma ductal invasivo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LN	Linfonodos
ln	Logaritmo natural

MCF-7	Linhagem celular epitelial mamária proveniente de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem celular epitelial tumorigênica proveniente de adenocarcinoma mamário
miRNA	microRNA maduro
n	Número
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NEG	negativo
P	Nível de significância estatística
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POS	positivo
RIN	Número de integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_m-alvo	RNA mensageiro alvo
RT	Transcrição reversa
RXR	Receptor de ácido retinóico
SBR	Escala Scarff-Bloom-Richardson
SFB	Soro fetal bovino
T	Timina
TCLE	Termo de consentimento Livre Esclarecido
TF	Tumor com história familiar
TH	Tipo histológico
TNF	Tumor não-familiar
Trip Neg	triplo negativo
UICC	União Internacional Contra o Câncer

RESUMO

O câncer de mama em mulheres jovens (idade igual ou abaixo de 35 anos) apresenta-se de forma mais avançada ao diagnóstico, possuindo grau histopatológico menos diferenciado. Além disso, as pacientes apresentam maior taxa de mortalidade e menor sobrevida livre de doença quando comparadas às pacientes menopausadas. Dentre os cânceres de mama em mulheres jovens, apenas 8 a 10% dos casos familiares estão relacionados a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e esta frequência nos casos esporádicos é ainda menor (3-10%). Assim, os fatores relacionados à desregulação oncogênica em mulheres jovens com ou sem antecedentes familiares que apresentam testes genéticos negativos para essas mutações não estão suficientemente esclarecidos. Tais evidências sugerem que o câncer em mulheres muito jovens apresenta características biológicas específicas. Considerando que a expressão gênica é regulada em múltiplos níveis, alguns estudos recentes tem referido a importância dos microRNAs neste processo tanto na degradação de RNAs mensageiros como na repressão da tradução. A análise da expressão dos microRNAs em câncer de mama tem revelado perfis característicos de determinados níveis de progressão da doença. No presente trabalho, nosso objetivo foi determinar o perfil de expressão de microRNAs em tumores de mama de mulheres jovens (idade igual ou abaixo de 35 anos) não-portadoras de mutações nos genes BRCA1/2. As pacientes foram subdivididas em 2 grupos [familiar (n=8) e não-familiar (n=20)] e, em seguida, os dados de expressão foram comparados aos obtidos em amostras normais de mamoplastia. A quantificação da expressão dos microRNAs foi realizada pela reação de RT-PCR em tempo real, utilizando o sistema *TaqMan microRNA Assay*. As análises estatísticas mostraram 246 miRNAs de expressão diferencial entre os 3 grupos (normal, familiar e não-familiar) sendo que, destes, encontramos 137 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos familiar e normal; 44 miRNAs entre os grupos não-familiar e normal e 4 miRNAs entre os grupos familiar e não-familiar. Nossos dados demonstram que os tumores do grupo de pacientes familiares quando comparados aos normais apresentam um perfil de miRNAs globalmente reduzido. O perfil de expressão de miRNAs no grupo de pacientes com câncer de mama esporádico é pouco distinto do grupo

com história familiar. Muitos dos miRNAs com expressão reduzida estavam envolvidos, de acordo com a literatura, numa sinalização comum relacionada a mecanismos de proliferação, apoptose e invasão celular. Os 4 miRNAs identificados como diferencialmente expressos entre os grupos familiar e não-familiar embora relacionados com outros tipos de cancer precisam de uma melhor caracterização em cancer de mama.

Descritores: microRNAs, neoplasia de mama, adulto jovem, idade de início, RT-PCR

SUMMARY

BASTOS EP. *Identification of microRNAs expression patterns in breast cancer in young women* [dissertation]. São Paulo “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010.

A rise in the incidence of breast cancer among young adult women (with age ≤ 35) was observed in recent decades. Breast cancer incidence in young woman has been correlated to poor survival and aggressive features. Due to different type of breast cancers in young woman, 8- 10% with familial history appears with mutation in BRCA1/2 genes, and similar proportion occurs in cases without familial history (3- 10%). However, early onset breast cancer patients with or without familial history, non carriers of BRCA1/BRCA2 mutations is not well elucidated. The deregulation by microRNAs has recently emerged as a major determinant of tumorigenesis. Because miRNAs function by targeting functionally important protein-coding genes, it is of outstanding interest to identify miRNAs involved in the molecular mechanism underlying aggressiveness in tumors of young patients that might represent biomarkers and therapeutic targets. This evidence suggests that breast cancer in young woman has specific biological characteristics. Understanding the patterns of miRNAs expression that potentially alter the regulation of key breast cancer genes we could give a better treatment to these patients. Thirty-two patients were selected: 8 with familial history of breast and ovarian suggestive of hereditary condition according to NCCN criteria and 20 without familial history. Patients of both groups were of non carriers of BRCA1/BRCA2 mutations. The determination of microRNA expression network between those 2 groups was performed by TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystems) using as control 3 normal mamoplastia samples from wealthy young women. Data were normalized using endogenous miRNA presented in each array. Statistical comparisons were done using ANOVA and Student T test with adjusted FDR (5%). It was found that 246 miRNAs were differently expressed between the 3 groups. From the comparison of familial group against normal group it was found 137 miRNAs differently expressed. In the comparison between non familial and

SUMMARY

normal group it was found 44 miRNAs differently expressed. Finally the comparison between familial group and non familial group it was found 4 miRNAs differently expressed. Among these miRNAs are some which was well characterized in breast cancer with down-regulation such as: miR-125b, miR-126 and miR-100. Our findings suggested that tumors from familial or sporadic cases presented discrete differences of microRNA expression patterns. A global down-regulation of 137 miRNAs in tumors from familial group of patients when compared to normal group was observed. Based on the literature, most of these miRNAs are related to mechanisms of proliferation, cells migration and apoptosis. To our knowledge, this is the first evidence of miRNA expression in tumors of early onset Breast Cancer patients, non carries BRCA1/2 mutation, providing insights that may lead to the detection of new conducts of treatment.

Descriptors: microRNAs, breast neoplasm, young adult, age of onset, RT-PCR

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama se constitui em uma das principais doenças que acometem a população do sexo feminino. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2010 foi de 49.240, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (www.inca.gov.br).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama estão relacionados à vida reprodutiva da mulher, tais como: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal. Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco (www.inca.gov.br), e está associada a dois tipos de câncer: o primeiro ocorre durante a pré-menopausa, sendo caracterizado pela ausência do receptor de estrógeno (ER⁻) e maior grau de agressividade; o segundo tipo ocorre durante a pós-menopausa, e está relacionado tanto à presença desse receptor (ER⁺), como a um menor grau de agressividade (Gonzalez-Ângulo *et al.*, 2005). Dentro de cada grupo, existem variações morfológicas, tais como os carcinomas medulares em tumores ER⁻ e os carcinomas tubulares e lobulares em tumores ER⁺ (Fernandopulle *et al.*, 2006).

O câncer de mama em mulheres jovens é apresentado por pacientes de idade menor ou igual a 35 anos, se constituindo, em sua maioria, em mulheres pré-menopausadas (Walker *et al.*, 1996). Embora esse tipo de câncer seja responsável por apenas 2% dos casos de câncer de mama, ele se apresenta de forma mais avançada ao diagnóstico, correspondendo a um grau histopatológico menos diferenciado (Foxcroft *et al.*, 2004; Gajdos *et al.*, 2000; Sidoni *et al.*, 2003). As pacientes também apresentam maior taxa de mortalidade e menor sobrevida livre de doença quando comparadas às pacientes menopausadas (Bertheau *et al.*, 1999; Joslyn, 1999). Além disso, Anders e colaboradores (2008) demonstraram que o perfil de expressão gênica tumoral apresentado por mulheres jovens é diferente do apresentado por mulheres pós-menopausadas. Tais evidências demonstram que as diferenças no comportamento biológico desses tumores

refletem mecanismos moleculares distintos, o que pode ser explicado pelo fato de que o desenvolvimento de cada um desses tumores ocorre em ambientes hormonais distintos.

A natureza agressiva do câncer de mama em mulheres jovens pode estar relacionada à ocorrência de mutações nos genes BRCA1/BRCA2, responsáveis pelo reparo do DNA (Yoshida e Miki, 2004). Apesar de estarem associadas tanto a casos com e sem histórico familiar de câncer de mama e ovário (Brandt *et al.*, 2010), tais alterações estão presentes em apenas a uma pequena parcela dos casos, a qual corresponde a 8-10% dos pacientes com câncer de mama familiar (Malone *et al.*, 1998; Lalloo *et al.*, 2006) e a 3.2-10.6% das mulheres com câncer não-familiar (esporádicos) (Malone *et al.* 1998). Tais evidências indicam que os mecanismos moleculares responsáveis pelo comportamento agressivo dos carcinomas de mama em mulheres jovens ainda não foram suficientemente esclarecidos.

Em colaboração com o Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), o Hospital do Câncer de Barretos e o Hospital A.C.Camargo de São Paulo, nosso grupo de pesquisa possui um projeto em desenvolvimento que tem como objetivo investigar a influência de outras alterações genéticas no desenvolvimento do câncer de mama em pacientes jovens que não apresentam mutações nos genes BRCA1/2. Os perfis de expressão gênica entre os grupos de câncer de mama familiar e não-familiar serão comparados entre si utilizando a metodologia de *microarray*. Considerando que os miRNAs exercem papéis importantes na regulação da expressão gênica associada ao estágio e progressão do câncer (Nelson *et al.*, 2004), estudos do perfil de expressão de miRNAs também podem revelar alterações nos processos de regulação que distinguem o surgimento de câncer de mama familiar e esporádico em pacientes jovens. Assim, decidimos realizar, paralelamente a esse projeto, o estudo do perfil de expressão de miRNAs nas mesmas pacientes. O presente trabalho visa (I) comparar o perfil de expressão de miRNAs em tumores de mama de pacientes com idade menor ou igual a 35 anos não portadoras de mutações nos genes BRCA1/2, subdivididos em 2 grupos (com ou sem histórico familiar) com aquele exibido em amostras de tecido normal com o objetivo de obter uma assinatura de miRNAs que possa

definir características biológicas e clínicas em tumores mamários de pacientes jovens; (II) identificar um painel de miRNAs diferencialmente expresso entre tumores esporádicos ou derivado de pacientes com história familiar.

1.1 . Molécula de microRNA

Os miRNAs foram descobertos em 1993 no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993) e representam uma classe de RNAs não-codificantes que possuem de 18 a 24 pares de bases de nucleotídeos. Seu papel na regulação gênica consiste na sua ligação a uma pequena sequência correspondente à região não traduzida 3' (3' UTR) do RNAm alvo específico, ocasionando um bloqueio na tradução protéica ou a degradação do RNAm alvo (Iorio *et al.*, 2005). Já foram descritos 600 miRNAs pertencentes à espécie humana (Berezikov *et al.*, 2005) e 1000 miRNA previstos por análise computacional (Pasquinelli *et al.*, 2000; Bentwich *et al.*, 2005). Uma vez que os miRNAs podem regular mais de um alvo, estimativas indicam que um único miRNA pode regular mais de 30% dos genes codificantes de proteína no genoma humano (Lewis *et al.*, 2005), comprovando sua importância como regulador global da expressão gênica.

A maioria dos miRNAs humanos são transcritos a partir da região intrônica de genes codificantes ou não-codificantes de proteínas, enquanto que a minoria pode ser transcrita a partir de sítios isolados no genoma ou da região 3'UTR do RNAm (Bartel, 2004). Os miRNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II em vários precursores de RNAs, normalmente com várias bases de comprimento e com estrutura secundária em forma de alça (*loop*) chamada de pri-miRNA. No núcleo, o pri-miRNA é protegido por um "CAP" na região 5' e poliadenilado na região 3' e apresenta uma estrutura em grampo que é clivada pelo complexo enzimático Drosha (membro da família RNase III) e seus co-fatores DGCR8/Pasha produzindo um segmento de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominado pré-miRNA (Cai *et al.*, 2004). Após ser transportado pela exportina 5 para fora do núcleo, o pré-miRNA é clivado por outra enzima RNase III, denominada Dicer, originando um fragmento de RNA dupla-fita de aproximadamente 22 nucleotídeos. O RNA dúplice originado pela ação da Dicer

contém a fita madura do miRNA e a fita passageira conhecida como miRNA* (Lau *et al.* 2001; Ricarte-Filho *et al.*, 2009). Como a complementariedade na região 5' entre as duas fitas é instável, ocorre um processo dinâmico no qual a fita madura do miRNA se associa à proteína Argonauta (Ago) dentro do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), enquanto a fita passageira miRNA* é separada do dúplex. A fita simples de miRNA madura associada ao complexo miRISC torna-se apta a regular a expressão do mRNA alvo. Comumente o alinhamento miRNA - RNAm alvo ocorre parcialmente na região 3'UTR o que provoca a repressão da tradução protéica. Esse alinhamento pode ser perfeito na região central do transcrito, causando a quebra do RNAm-alvo (Hutvagner e Zamore, 2002; Negrini e Calin, 2008). Atualmente, são conhecidas 4 proteínas Ago codificadas pelo genoma de mamíferos e dos peixes, sendo que apenas a Ago2 parece ser capaz de clivar o transcrito alvo em humanos. Os mecanismos envolvidos na inibição da tradução pelos miRNAs ainda não estão bem esclarecidos (Martinez *et al.*, 2002) (**figura 1**).

Figura 1. Ilustração da biogênese dos microRNAs (Olena e Patton, 2010).

Baseando-se na homologia entre as regiões terminais 5' do miRNA maduro, os miRNAs podem ser agrupados em famílias. Essa região foi preservada durante a evolução, o que implica no seu importante papel na conservação da forma madura dos miRNAs e na incorporação do RISC para a formação do complexo miRISC (Brennecke *et al.*, 2005). Considerando seu papel no processo de reconhecimento do RNAm alvo, a região 5' do miRNA também tem sido utilizada para o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática destinadas à predição de possíveis alvos dos miRNAs ao longo do genoma. Com o auxílio dessas ferramentas, já foram preditos mais de 200 alvos para cada miRNA (Stahlhut e Slack, 2006).

A expressão alterada dos miRNAs em diversos tipos de tumores (Michael *et al.*, 2003) indica sua participação como oncogenes (Hoffman *et al.*, 2009), visto que tais alterações podem afetar o ciclo celular e a programação da diferenciação celular (Yu *et al.*, 2010). Além disso, mais de 50% das regiões genômicas a partir das quais se originam os miRNAs estão localizadas em sítios frágeis do cromossomo, os quais apresentam-se deletados ou amplificados no câncer (Calin *et al.*, 2004). Nesse contexto, Calin e colaboradores (2002) forneceram as primeiras evidências do envolvimento de miRNAs em câncer, mostrando que a região 13q14 deletada em pacientes com leucemia linfocitária crônica (LLC) continha sequências relacionadas à expressão de miR-15a e miR-16-1.

No câncer de mama, a desregulação na expressão de miRNAs têm sido detectadas em casos metastáticos e de pior prognóstico, sugerindo funções importantes na oncogênese mamária e na progressão do câncer (Iorio *et al.*, 2005; Silveri *et al.*, 2006; Si *et al.*, 2007). Em trabalhos com linhagens tumorais mamárias, miRNAs foram descritos como relacionados à agressividade do câncer de mama e a sensibilidade de linhagens tumorais mamárias humanas à terapia anti-estrógeno (Zhao *et al.*, 2008). Por exemplo, a superexpressão de miR-10b promove a ativação da proteína *RHO*C por intermédio do seu gene-alvo *HOXD10*, facilitando os processos de invasão e metástase (Tan *et al.*, 2009).

Considerando que os miRNAs parecem exercer um papel importante na tumorigênese mamária, a determinação do perfil de expressão diferencial de miRNAs em mulheres jovens pode auxiliar na identificação de marcadores moleculares que permitam elucidar mecanismos envolvidos na agressividade desses tumores, em pacientes com ou sem história familiar.

1.2. Justificativa

Embora pouco frequente, o câncer de mama em mulheres muito jovens está associado a características clínico-patológicas agressivas. Os mecanismos moleculares envolvidos nesse tipo de câncer não estão bem estabelecidos, principalmente nos casos de pacientes que não apresentam mutações nos genes BRCA 1/ 2. Considerando a relação entre a regulação da expressão gênica por

miRNAs e o prognóstico do câncer de mama, nossa abordagem permite ampliar o entendimento do papel biológico dos miRNAs associados a este comportamento agressivo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização do perfil de expressão de miRNAs em amostras de tumores malignos de mama de pacientes com idade menor ou igual a 35 anos com e sem história familiar e não portadoras de mutações nos genes BRCA 1/ 2 e comparar esses perfis ao exibido por amostras normais de tecido mamário obtidos de mamoplastia. Identificar miRNAs cuja a expressão seja especificamente diferente entre amostras tumorais de pacientes jovens com ou sem historia familiar.

2.2. Objetivos específicos

- a) Determinar o perfil de expressão de miRNAs por *TaqMan microRNA Assay-array* em amostras de carcinoma ductal invasivo de mama provenientes de pacientes jovens subdivididas em dois grupos: com história familiar e esporádicos. Serão utilizadas amostras tumorais negativas para as mutações nos genes BRCA1/2. Comparar os perfis de expressão com aquele expresso em 3 amostras de mamoplastia de pacientes jovens saudáveis com idade similar.
- b) Determinar o perfil de expressão de miRNAs por *TaqMan microRNA Assay* em linhagens celulares (Hb4a, MCF-7, MCF-10 e MDA-MB-231).
- c) Busca *in silico* por potenciais alvos dos miRNAs diferencialmente expressos nas comparações: familiar vs normal; não-familiar vs normal; familiar vs não-familiar.
- d) Utilizar os miRNAs diferencialmente expressos de cada comparação para validação em 7 amostras independentes.

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes

Para identificação e estudo dos perfis de expressão dos miRNAs em pacientes jovens com câncer de mama, foram obtidas amostras provenientes de 32 pacientes com idade ≤ 35 anos que apresentavam carcinoma ductal invasivo de mama atendidas no Hospital A.C. Camargo, no Hospital do Câncer de Barretos e no Instituto Brasileiro de Controle de Cancer (IBCC). Das amostras selecionadas, 10 correspondiam a mulheres com história familiar e 22 foram derivadas de pacientes sem história familiar. Este trabalho passou pelas Comissões de Ética do Hospital A.C. Camargo (1291/09), do Hospital do Câncer de Barretos e do IBCC. Todas as amostras foram obtidas com o consentimento informado das pacientes.

O tecido mamário de 3 mulheres saudáveis na mesma faixa etária das pacientes foi incluído como referência na identificação de miRNAs diferencialmente expressos. As amostras foram reservadas em freezer – 80 para a realização da extração do RNA e DNA. O sangue das pacientes também foi coletado para verificação da presença de mutações nos genes BRCA1/2, com o intuito de selecionar apenas as pacientes não-portadoras dessas alterações. Os dados clínicos, patológicos, radiológicos e demográficos foram adquiridos a partir de prontuários médicos incluindo: idade, patologia do tumor, grau histológico e nuclear, expressão de receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) e do fator de crescimento epidermal tipo 2 (HER-2). Os dados epidemiológicos e as informações da história familiar foram obtidos a partir de questionários e entrevistas realizados pela Dra. Maria Isabel Achatz, MD, PhD do Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo com a colaboração do Dr. Rodrigo Augusto Depieri Michelli, MD do Hospital do Câncer de Barretos. Os pacientes com história familiar passaram por critérios de inclusão baseados no critério de NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), o qual inclui: mutação detectada nos genes *BRCA1/BRCA2*; história pessoal de câncer de mama + um ou mais dos seguintes itens: diagnóstico ≤ 40 anos; diagnóstico ≤ 50 anos ou 2

tumores primários de mama (bilateral ou ipsilateral) + 1 ou mais parentes com câncer de mama ≤ 50 ou 1 parente com câncer de ovário; diagnóstico em qualquer idade + 2 parentes próximos com câncer de ovário em qualquer idade; diagnóstico em qualquer idade + 2 parentes próximos com câncer de mama; parente masculino com câncer de mama; história pessoal de câncer de mama; descendente étnico associado à mutação deletéria (exemplo: populações com mutações fundadoras como Judeus Ashkenasi, Húngaros, etc) ou história de câncer de mama ou ovário em parente próximo. Entra no critério também história pessoal de câncer de ovário + um ou mais dos seguintes itens: parente próximo com câncer de ovário; parentes de sangue próximos com câncer de mama; parente masculino próximo com câncer de mama; descendente de Judeus Ashkenasi. Inclui nos critérios: história pessoal de câncer de mama em homem particularmente um ou mais dos seguintes itens: + um parente masculino com câncer de mama; parente sexo feminino com câncer de ovário; descendente de Judeus Ashkenasi; somente história familiar + parente próximo com algum destes critérios acima.

3.2 Cultura de células

Com o objetivo de verificar se os dados obtidos estariam de acordo com a literatura e confirmar a eficácia da metodologia adotada, foi realizada a análise de expressão dos miRNAs nas seguintes linhagens mamárias humanas: Hb4a (derivada de epitélio luminal normal e imortalizada por vírus SV40), MCF-10a (célula epitelial mamária normal), MDA-MB-231 (proveniente de carcinoma triplo-negativo metastático) e MCF-7 (carcinoma luminal)

As células Hb4a e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI1640 (Gibco), enquanto que as células MCF-10 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM/HAMF12 (Invitrogen) e meio Lebovit's (Gibco), respectivamente. Todos os meios foram suplementados com soro fetal bovino (SFB) 10% e receberam gamicina (40 $\mu\text{g/mL}$) e anfotericina B (2,5 $\mu\text{g/mL}$) para evitar contaminação bacteriana e por fungos e leveduras. Outros suplementos foram utilizados para algumas linhagens, tais como 20 ng/mL de EGF (fator de crescimento epidermal)

para a linhagem MCF-10a, além de insulina (5 µg/mL) e hidro cortisona (100 µg/mL) para as linhagens Hb4a e MCF-10. Ao atingir a confluência de 90%, as células foram tripsinizadas e submetidas à centrifugação. A partir do pellet com $< 5 \times 10^6$ de células a extração do RNA total das linhagens foram realizadas com o auxílio do reagente *RNeasy Mini Kit*.

3.3. Extração do DNA e RNA total

A extração do DNA das amostras das pacientes foi realizada a partir do sangue periférico, coletado em um tubo com anticoagulante (*buffy coat*). A extração do DNA foi realizada após a obtenção dos leucócitos por centrifugação, utilizando o *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen) e seguindo o protocolo sugerido pela empresa, com adaptações. O material recuperado foi reservado em um tubo com anticoagulante, ao qual foram adicionados 600 µl de *Cell Lysis Solution*, e, em seguida, a mistura foi incubada à temperatura de 55 °C por 12 horas. Após a adição de 140 µl de *Protein Precipitation Solution*, a mistura foi incubada no gelo por 15 minutos e centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual adicionou-se 600 µl de isopropanol 100%, seguindo-se nova centrifugação (14.000 rpm por 30 minutos a 4°C). Após descarte do sobrenadante, o *pellet* de DNA foi ressuspendido em água ultra pura. A quantidade e qualidade do DNA foram verificadas, respectivamente, no *NanoDrop* e em corrida em gel de agarose 0.8%.

A extração de RNA das amostras não foi realizada de forma específica para a obtenção dos miRNAs. A utilização do *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, número de catálogo 217004) foi destinada à extração do RNA total das amostras, o qual contém os fragmentos pequenos de RNAs correspondentes aos miRNAs. As amostras das pacientes correspondiam às biópsias de câncer de mama ou mamoplastias congeladas a -80° C até o momento da extração. O tecido foi fragmentado no equipamento com esferas magnéticas *Precellys*® (BioAmerica Inc), seguindo-se a adição de 600 µl de *RLT Buffer* e de etanol 70% (diluído em água DEPC). Após homogeneização, todo o volume foi transferido para a coluna

do kit (*RNeasy spin column*). Após a centrifugação a 10.000 rpm por 15 segundos, foram adicionados 700 ul de *Buffer RW1* sobre a membrana da coluna, submetida à nova centrifugação (por 15 segundos a 10.000 rpm). Em seguida, foram adicionados 500 ul de *Buffer RPE* (diluído na razão 1:4 em etanol 100%) sobre a membrana, centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm. Foram então adicionados 500 ul de etanol 80% na coluna, centrifugada nas mesmas condições. O RNA purificado foi recuperado da membrana pela adição de 30 ul de água ultra pura, incubando-se a coluna durante 2 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugando-a por 1 minuto a 13.000 rpm. A quantificação do RNA total foi realizada utilizando o equipamento *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Agilent) e, para verificar a integridade do RNA total extraído, 1 uL de cada amostra foi submetido à leitura no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* utilizando o nano ou pico Chip. Com o auxílio do programa *Agilent 2100 expert software version B.02.04* foi calculado, para cada amostra, o RIN (*RNA Integrity Number*), indicador da integridade do RNA total. Foram consideradas amostras de qualidade satisfatória aquelas que apresentaram valores de $RIN \geq 5$, e para as quais foi possível visualizar a presença de miRNAs situados tipicamente na faixa de 10 a 40 nucleotídeos (nt) nos gráficos (eletroferogramas) construídos pelo aparelho.

3.4. Sequenciamento

O sequenciamento das 32 amostras para confirmar a ausência de mutação nos genes BRCA1/2 foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Hospital A.C. Camargo sob supervisão da Dra. Dirce Maria Carraro. A partir do DNA extraído do sangue periférico das pacientes, a reação de PCR foi realizada utilizando 23 pares de *primers* para o gene BRCA1 e 28 pares de *primers* para o gene BRCA2. Após a amplificação dos fragmentos, a especificidade da reação foi confirmada pela corrida do produto amplificado em gel de agarose. A purificação do produto de PCR foi realizada após a adição de 1 ul da enzima ExoSAp e incubação da reação por 30 minutos a 37°C, seguido por 5 minutos a 80°C. A

reação foi precipitada adicionando-se 1 ul de acetato de sódio (3M, pH 8.0), 1 ul EDTA (250mM, pH 8.0) e 25 ul de etanol 100%, seguindo-se a incubação em temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C. Após dispensar todo o volume, foram acrescentados 35 ul de etanol 70% gelado e as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm a 4°C, seguindo-se a incubação a 95°C por 20 minutos para secagem do produto. O sequenciamento foi realizado após a adição de 13 ul de formamida Hi-Di, utilizando o aparelho *ABI 3130* (Applied Biosystems) e o kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas com os fragmentos dos genes BRCA1/2 normais obtidos pelo banco de dados do NCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta *BLC Main Worckbench 5* (<http://www.clcbio.com/>).

3.5. RT-PCR em tempo real- sistema *TaqMan microRNA Assay*

A reação de RT-PCR em tempo real ocorre de modo exponencial, ou seja, a cada ciclo da reação, novas moléculas de cDNA dupla-fita são sintetizadas. O fluoróforo utilizado no processo é incorporado a cada cadeia de DNA recém-sintetizada, e, conseqüentemente, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente. Assim, o número de ciclos correspondentes ao início da emissão de fluorescência (ciclo *threshold* – C_T), é inversamente proporcional ao nível de expressão do transcrito, sendo menor durante a aquisição de sinal de amostras que possuem maior abundância do gene em questão (Morrison *et al.*, 1998). O C_T é definido pelo usuário utilizando o gráfico construído pelo *software* de análise do aparelho e situa-se na fase exponencial da emissão de fluorescência (Morrison *et al.*, 1998).

A partir do RNA total (350 ng) foram realizadas as etapas da metodologia do sistema *TaqMan microRNA Assay* (**figura 2**). Na primeira etapa, foi realizada a reação de transcrição reversa com o auxílio do kit otimizado *Megaplex™* (Applied Biosystems, número de catálogo # 4399966). Esse kit possui um *pool* de diferentes *primers* (*RT Primers Human Pool A*), sendo que cada um reconhece e é responsável pela transcrição reversa de um miRNA específico. Desse kit, foram

utilizados: 0.8 ul de *RT Primers Human Pool A 10x*; 15 ul de *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (50 U/ul)*; 0.8 ul de *Reverse transcription Buffer 10X*; 0.9 ul de dNTPs (100mM); 0.9 ul de $MgCl_2$ (25 mM); 0.1 ul de inibidor de RNase (20U/ul), completando 50 ul de volume final. Com o objetivo de otimizar a quantidade de miRNAs (principalmente dos miRNAs menos expressos), foi realizada uma reação de pré-amplificação, utilizando 2.5 ul de *Megaplex™ PreAmp Primers Human Pool A10X* e 12.5 ul de *TaqMan® PreAmp Master Mix 2X* (Applied Biosystems, número de catálogo # 4399233 e # 4391128, respectivamente).

O produto da pré-amplificação foi diluído em 75 ul de EDTA 0.1X (pH 8.0) dos quais apenas 9 ul foram utilizados para a realização da reação de RT-PCR em tempo real, adicionando 450 ul de TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG) , e 441 ul de água ultra pura. Dessa mistura, apenas 100 ul foram aplicados em cada uma das 8 canaletas da placa de microRNA *TaqMan® Human microRNA A Array v2.0* (Applied Biosystems, número de catálogo # 4398965). Cada poço na placa contém um par de *primers* liofilizado específico para a amplificação de um determinado miRNA. Como essa placa contém 384 poços, incluindo quatro controles normalizadores, sendo três endógenos em duplicata e um negativo (correspondente a sequências não relacionadas ao genoma de *Homo sapiens*), essa metodologia possibilita a quantificação de até 377 microRNAs humanos. Após a aplicação das amostras, a placa foi submetida à centrifugação por 2 minutos na rotação de 1.200g e, em seguida, selada para a realização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando o aparelho *7900 PCR System* (Applied Biosystems) de acordo com as sugestões do fabricante.

Figura 2. Esquema da metodologia - sistema *TaqMan Real Time* da Applied Biosystems

3.6. Análise dos dados.

As análises de expressão dos miRNAs foram feitas baseando-se no valor de C_T (*cycle threshold*) apresentado por cada amostra durante a reação de PCR em tempo real (RT-PCR) e gerado pelo programa *Real Time SDS® Software* (Applied Biosystems). A normalização das amostras foi realizada pelo programa *RQ Manager* (Applied Biosystems), utilizando o valor de expressão do RNA ribossomal RNU48 de modo a minimizar as variações decorrentes da própria metodologia, tornando possível analisar resultados biologicamente relevantes (Gennarino *et al.*, 2009). O valor de C_T normalizado foi obtido utilizando o valor calculado do C_T da amostra subtraído do C_T do RNU48, resultando no valor de ΔC_T .

A detecção dos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens foi realizada comparando-se os valores de expressão das linhagens normais (Hb4a e MCF-10a) em relação aos valores obtidos entre as linhagens tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7). Considerando as amostras de pacientes, os valores de expressão foram comparados entre os tumores de mama oriundos de pacientes com e sem história familiar em relação a amostras de mama normais. Foram obtidos três grupos de comparação: (1) familiar vs normal, (2) não-familiar vs normal e (3) familiar vs não-familiar. O valor final de expressão foi obtido pelo cálculo de $2^{-\Delta C_T}$ e, em seguida, esse valor foi comparado estatisticamente entre os grupos de cada comparação. O valor de *fold change* foi obtido pela razão do valor de $2^{-\Delta C_T}$ de uma amostra em relação à outra em cada grupo de comparação, conforme a seguinte fórmulas: $(2^{-\Delta C_T \text{ amostra}_{\text{tumoral}}}) / (2^{-\Delta C_T \text{ amostra}_{\text{normal}}})$ e $(2^{-\Delta C_T \text{ amostra}_{\text{familiar}}}) / (2^{-\Delta C_T \text{ amostra}_{\text{não-familiar}}})$ (Wong *et al.* 2008).

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) e *Test t de Student*, utilizando o número máximo de permutação possíveis, com o valor de FDR de 5%. Os miRNAs foram submetidos ao agrupamento hierárquico usando os parâmetros de distância Euclidiana como métrica e *average linkage* como medida de semelhança. Todas essas análises foram realizadas no programa *MeV* (*Multi Experiment Viewer* versão 4.5), pelo

grupo de Bioinformática do Hospital A.C.Camargo, sob supervisão da Dra. Helena Brentani.

3.7. Nomenclatura dos microRNAs

A nomenclatura dos miRNAs é baseada em números de identificação sequencial. O prefixo se designa à espécie, sendo que o termo "hsa" refere-se à espécie humana (*Homo sapiens*). A sequência madura dos miRNAs é designada "miR" enquanto que o precursor em forma de alça recebe o prefixo "mir". Os miRNAs maduros com sequências que diferem em uma ou duas posições (sequências parálogas) recebem uma letra situada após o número de identificação, como por exemplo hsa-miR-10 e hsa-miR-10a. Quando dois miRNAs de sequências distintas surgem do mesmo mir-precursor, porém originam-se de fitas opostas, recebem a extensão 3p ou 5p [(hsa-miR-17-5p (braço 5') e hsa-miR-17-3p (braço 3'))] (Griffiths *et al.*, 2006).

3.8. Confirmação *in silico*

Para identificar os possíveis RNAs mensageiros alvos dos miRNAs diferencialmente expressos de cada comparação, foram utilizadas 6 ferramentas: *PicTar*, *miRBase*, *TargetScan*, *MicroCosm Target*, *miRDB* e *PITA*. De forma geral, esses bancos de dados realizam a predição de RNAm-alvos de um dado miRNA pela busca de regiões complementares entre a sequência 5' UTR do miRNA de interesse e a sequência 3' UTR de transcritos humanos disponíveis nos bancos de dados de transcriptomas. Além de exibir esses critérios, o banco de dados *PITA* (*Probability of interaction by target accessibility*) utiliza a estabilidade termodinâmica como parâmetro adicional para avaliar a possibilidade de interação entre a sequência do miRNA como um todo e seu possível transcrito-alvo predito. Esse programa tem sido descrito, dentre os diversos programas de predição, como o mais acurado na busca de alvos que foram validados experimentalmente (Kertesz *et al.*, 2007). De acordo com Dalmay (2008), consideramos RNAm-alvos de um dado miRNA aqueles preditos por mais de uma

ferramenta, com o objetivo de minimizar a influência de falsos positivos e negativos.

3.9. Validação

Com o objetivo de validar os miRNAs encontrados como diferencialmente expressos em cada comparação (familiar vs normal; familiar vs normal e familiar vs não-familiar), selecionamos 7 amostras independentes (3 com história familiar e 4 sem história familiar) de pacientes na mesma faixa etária e com o mesmo tipo de carcinoma mamário em relação às amostras iniciais. O perfil de expressão de tais amostras foi comparado ao mesmo grupo de amostras de mamoplastia de mulheres saudáveis utilizado anteriormente.

Ao contrário dos ensaios iniciais, nos experimentos de validação, a transcrição reversa não foi realizada utilizando um *pool* de *primers*, visto que foi usado apenas o par de *primers* correspondente à sequência de determinado miRNA encontrado como diferencialmente expresso (*RT-primer*). Cada reação foi realizada em volume final de 15 μ l, contendo 5 μ l de RNA total (10ng), 3 μ l de *RT-primer*, 7 μ l de *Master Mix Buffer 10X*. A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada em triplicata, utilizando em cada reação 1 μ l de *TaqMan microRNA Assay Primer*, 1.33 μ l do produto de RT e 10 μ l de *TaqMan 2x Universal PCR Master Mix*, totalizando o volume de 20 μ l.

Da mesma forma que o experimento *TaqMan microRNA Assay*, as análises da validação de expressão dos miRNAs foram feitas baseando-se no valor de C_T (*cycle threshold*) e a normalização das amostras foi realizada pelo programa *RQ Manager* (Applied Biosystems), utilizando o valor de expressão do RNA ribossomal RNU48.

O valor de C_T normalizado foi obtido utilizando o valor calculado do C_T da amostra subtraído do C_T do RNU48, resultando no valor de ΔC_T . O valor final de expressão foi obtido pelo cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ utilizando a fórmula: $(\Delta C_T \text{ tumoral}) - (\Delta C_T \text{ referência})$. A amostra referência nas comparações familiar vs normal e não-familiar vs normal foi uma das três amostras provenientes de mulheres jovem saudáveis e na comparação familiar vs não-familiar, a referência utilizada foi uma das amostra

tumorais sem história familiar (paciente n°. 4 da tabela 1). O valor de *fold change* foi obtido pela razão do valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de uma amostra em relação à outra em cada grupo de comparação, conforme as seguintes fórmulas: $(2^{-\Delta\Delta CT}_{\text{familiar}} / 2^{-\Delta\Delta CT}_{\text{normal}})$; $(2^{-\Delta\Delta CT}_{\text{não-familiar}} / 2^{-\Delta\Delta CT}_{\text{normal}})$ e $(2^{-\Delta\Delta CT}_{\text{familiar}} / 2^{-\Delta\Delta CT}_{\text{não-familiar}})$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das pacientes e amostras

As 32 pacientes selecionadas para o nosso estudo foram previamente atendidas pelo Aconselhamento Genético do Hospital A.C Camargo e Hospital do Câncer de Barretos, o que possibilitou a obtenção dos dados clínico-patológicos descritos na **tabela 1**. Nessa tabela, é possível observar que 10 amostras tumorais foram provenientes de pacientes com história familiar e 22 foram obtidas de mulheres sem história familiar (esporádicos). Em relação aos receptores hormonais, todos foram avaliados por imuno-histoquímica, sendo que a presença de ER e PR foi considerada positiva quando mais de 10% das células tumorais expressavam os respectivos antígenos. A presença do receptor HER-2 foi avaliada de acordo com os critérios da ASCO (Wolff *et al.*, 2007), ou seja, as amostras foram submetidas à marcação imuno-histoquímica e foram considerados como positivas as amostras classificadas como 3 +. Em casos duvidosos (2+), os resultados foram confirmados por FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*). A caracterização tumoral em subtipos moleculares baseou-se na presença dos receptores ER, PR e HER-2.

Tabela 1. Dados das 32 pacientes analisadas no estudo.

n°	Idade	Código da amostra	Grau	TNM	Característica	CA mama familiar	ER	PR	HER-2
1	33	MJ01001T	GH3 GN3	IIA	Luminal B	NÃO	POS	POS	POS+++
2	35	MJ01004T	GH2 GN3	IIA	Luminal B	NÃO	POS	POS	POS++ (Fish amplificado)
3	33	MJ01006T	GH3 GN3	IIB	Luminal B	NÃO	POS	POS	(POS++) NEG
4	25	MJ01007T	GH2 GN2	IV	Trip. NEG	NÃO	NEG	NEG	NEG
5	33	MJ01009T	GH2 GN3	IIB	Trip. NEG	NÃO	NEG	NEG	NEG
6	30	MJ02002T	GN2 GH2	IIB	Luminal B	NÃO	POS	POS	POS+++
7	26	MJ02003T	GN3 GH3	IIB	Trip. NEG	NÃO	NEG	NEG	NEG
8	29	MJ02005T	GN3 GH3	IIA	Luminal A	NÃO	POS	NEG	NEG
9	33	MJ02008T	GN2 GH2	IIIA	Luminal A	NÃO	POS	NEG	NEG
10	35	MJ02014T	GN3 GH3	IIA	Trip. NEG	NÃO	NEG	NEG	(POS++) NEG
11	34	MJ02019T	GN2 GH1	IV	Luminal B	NÃO	POS	POS	POS+++
12	35	MJ02027T	GN3 GH2	IIB	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG
13	32	MJ02028T	GH2	IIA	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG
14	34	MJ02033T	GN3 GH2	IIB	Trip. NEG	NÃO	NEG	NEG	NEG
15	30	MJ04025T	GH2	IIIB	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG
16	29	MJ04011T	GH2	I	Luminal B	NÃO	POS	POS	POS+++
17	31	MJ04015T	GH2	IIIA	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG
18	33	MJ04019T	GN2 GH1	IIA	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG
19	35	MJ04020T	GH2	IIIB	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG
20	28	MJ04028T	GN2 GH2	IIA	Luminal B	NÃO	POS	POS	NEG
21	28	MJ02001T	GN3 GH2	IIB	Luminal B	NCCN	POS	POS	POS+++
22	34	MJ02004T	GN3 GH2	IIB	Luminal A	NCCN	POS	POS	NEG

n°	Idade	Código da amostra	Grau	TNM	Característica	CA mama familiar	ER	PR	HER-2
23	35	MJ02006T	GN3 GH2	IIA	Luminal A	NCCN	POS	POS	(POS++) NEG
24	29	MJ02007T	GN3 GH3	IIIA	Luminal A	NCCN	POS	POS	(POS++) NEG
25	29	MJ02012T	GN3 GH3	IIA	Trip. NEG	NCCN	NEG	NEG	NEG
26	29	MJ02013T	GN3 GH3	IIB	Luminal A	NCCN	POS	POS	NEG
27	34	MJ02015T	GN3 GH2	IIB	Luminal A	NCCN	POS	POS	(POS++) NEG
28	36	MJ02024T	GN3 GH3	IIA	Luminal B	NCCN	POS	POS	POS
29	27	MJ02021T	GN3	IIA	Trip. NEG	NCCN	NEG	NEG	NEG
30	33	MJ02023T	GN3 GH3	IIA	Her-2	NCCN	NEG	NEG	POS+++
31	35	MJ02025T	GN3 GH3	II	Luminal A	NÃO	POS	POS	(POS++) NEG
32	31	MJ02026T	GN3	IIA	Her-2	NÃO	NEG	NEG	(POS++) NEG

CONTINUAÇÃO TABELA 1.

*1: CA = Câncer; POS = positivo; NEG = negativo; Trip. NEG = triplo negativo; CDI = câncer ductal invasivo; GN = grau nuclear; GH = grau histológico; ER = receptor de estrogênio; PR = progesterona; HER-2 = receptor de fator de crescimento tipo 2; NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*.

*2: A classificação dos tumores foi feita de acordo com o modelo proposto por Carey e colaboradores (2006): subtipo luminal A (ER⁺ e/ou PR⁺ e HER-2⁻); subtipo luminal B (ER⁺ e/ou PR⁺ e HER-2⁺); subtipo HER-2 superexpresso (HER-2⁺ e ER⁻/PR⁻) e subtipo triplo negativo (ER⁻/PR⁻/HER-2⁻).

*3: Os tumores também foram classificados em estádios de acordo com as recomendações do sistema TNM, sugeridas pelo Sub-Comitê de Registros de Casos de Câncer e Apresentação Estatística, da Organização Mundial da Saúde (OMS): I (T1N0M0); IIA (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0); IIB (T2N1M0,T3N0M0); IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0); IIIB (T4N0M0,T4N1M0, T4N2M0); IV (qualquer T, qualquer N e M1).

Baseado no banco de dados da *Breast Cancer Information Core (BIC)* e de acordo com os resultados de sequenciamento dos genes BRCA1/2, foi visto que as pacientes n° 29, 30, 31 e 32 apresentavam mutações no BRCA1 com relevância clínica, dentre elas: mutação C61G no éxon 5 (n° 29), inserção 5382insC no éxon 20 (n° 30); deleção 3036del no éxon 11 (n° 31) e deleção 3450del no éxon 11 (n° 32). Portanto, prosseguimos o estudo com 28 amostras.

Com o objetivo de verificar o perfil clínico-patológico das 28 pacientes de acordo com a distribuição entre os grupos com e sem história familiar, os dados foram organizados conforme mostra a **tabela 2**.

Tabela 2. Distribuição das características clínico-patológicas das 28 pacientes com e sem história familiar

	Familiar (n=8)		Não Familiar (n=20)		Total (n=28)		p-value
	n	%	n°	%	n°	%	
Estadiamento							
I	0	0	0	0	0	0	ND
IIA	3	37,5	7	35	10	37	
IIB	4	50	6	30	10	37	
IIIA	1	12,5	2	10	3	11	
IIIB	0	0	2	10	2	7	
IV	0	0	2	10	2	7	0,46
27 Total							
Tipo histológico							
Ductal invasivo	8	100	20	100	28	100	
Lobular	0	0	0	0	0	0	
28 Total							
Grau histológico							ND
I	0	0	2	10	2	7	
II	4	50	12	60	16	57	
III	4	50	6	30	10	36	
28 Total							
Grau Nuclear							ND
I	0	0	0	0	0	0	
II	0	0	6	30	6	26	
III	8	100	9	45	17	74	
23 Total							
ER							0,64
Positivo	7	87,5	15	75	22	79	
Negativo	1	12,5	5	25	6	21	
28 Total							
PR							0,37
Positivo	7	87,5	13	65	20	71	
Negativo	1	12,5	7	35	8	29	
28 Total							
Her-2							0,63
Positivo	2	25	5	25	7	25	
Negativo	6	75	15	75	21	75	
0							
Luminal A	5	31,3	8	29,6	13	46	ND
Luminal B	2	12,5	7	25,9	9	32	
Triplo negativo	1	6,3	5	18,5	6	21	
Her-2	0	0	0	0,0	0	0	
28							

Tabela 2. ND: amostras cujo *p-value* obtido pelo teste qui-quadrado na comparação familiar vs. não familiar não foi determinada pelo *software InSTAT*.

O estadiamento IIB foi o mais frequente no grupo de pacientes com história familiar (50%) e a frequência do estadiamento IIA foi semelhante em ambos os grupos. Enquanto que o grau histológico II foi mais frequente no grupo de câncer não-familiar (60% vs 50% no grupo familiar), o grau histológico III foi mais frequente no grupo de câncer familiar (50% vs 30% no grupo não-familiar). O grau nuclear III apresentou maior frequência nos tumores do grupo familiar (100%) em relação ao esporádico (45%). No grupo dos pacientes com câncer esporádico 75% dos casos foram classificados como ER⁺ ao passo que no grupo de tumores de pacientes com história familiar 87,5% mostraram positividade para o ER. Considerando a presença dos demais receptores, os tumores do grupo familiar apresentaram maior positividade de PR (87,5%) comparados aos tumores do grupo não-familiar (65%) e ambos os grupos apresentaram poucos casos HER-2⁺ (25%). A classificação dos tumores em subtipos mostrou predominância dos grupos Luminal A e B tanto nos tumores do grupo familiar como no grupo não-familiar. O subgrupo triplo-negativo correspondeu a 6.3% do grupo familiar e 18.5% do grupo não-familiar. Além disso, não foi encontrado nenhum caso de pacientes com tumores do subtipo HER-2.

As análises estatísticas mostraram que as diferenças entre os tumores dos grupos familiar e não-familiar para as categorias relacionadas ao tipo histológico e presença dos receptores hormonais (ER, PR e HER-2) não atingiram a significância estatística (*p-value* < 0.05) pelo teste qui-quadrado (*software InSTAT*).

4.2. Caracterização das linhagens

As linhagens Hb4a, MCF7, MCF10 e MDA-MB-231 foram cultivadas até a 4ª passagem, na qual foram tripsinizadas quando atingiram 90% de confluência. Durante esse período, todas elas mantiveram a morfologia típica no caso da Hb4a (Stamps, 1997) e das demais linhagens (disponível em: [http:// www.atcc.org](http://www.atcc.org)) (figura 3).

Figura 3. Foto do microscópio óptico das linhagens celulares Hb4a, MCF7, MCF10 e MDA-MB-231 cultivadas em cultura até a 4ª passagem.

4.3 Qualidade e quantidade do RNA total

A quantificação do RNA total foi verificada no equipamento *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Agilent), a qual mostrou que o rendimento do RNA total variou de 1 a 15 ug. A integridade do RNA total foi verificada no aparelho *Bioanalyzer* (Agilent), utilizando o pico Chip e nano Chip, o qual mostrou valores de RIN situados entre 5 a 10 para a maioria das amostras, comprovando a boa qualidade do RNA (Schroeder *et al.*, 2006). tanto para as linhagens celulares (figura 4) como para as amostras tumorais de pacientes (figura 5). A existência de discretos picos na região entre 10 e 40 nucleotídeos indicou a presença do miRNA em todas as amostras.

Figura 4. Imagem do programa *Agilent 2100 expert software* (version B.02.04) mostrando a qualidade (RIN) do RNA total extraído das linhagens.

Figura 5. Imagem do programa *Agilent 2100 expert software* (version B.02.04) mostrando a qualidade (RIN) do RNA total extraído das 28 amostras (tumor e normal) incluídas no estudo.

4.4. Resultados da expressão de miRNAs em linhagens

Os dados de expressão das linhagens foram submetidos ao programa *MeV* no qual foi realizada a análise estatística Test-T com permutação, corrigido pelo valor FDR de 5%. Foram obtidos 7 miRNAs de expressão significativamente reduzida no grupo das linhagens tumorais (MDA-MB-231 e MCF7) em relação ao grupo das linhagens normais (Hb4a e MCF-10A), sendo eles: hsa-miRNA-196b; hsa-miRNA-202; hsa-miRNA-224; hsa-miRNA-452; hsa-miRNA-494; hsa-520b; hsa-miRNA-615-5p. O miR-224 foi excluído das análises posteriores visto que foi o único a apresentar valores de $C_T > 39$, o que demonstrou seu baixo nível de detecção nas linhagens analisadas. Na tabela 3, é possível observar a reduzida expressão dos 6 miRNAs nas linhagens tumorais em relação às normais. As análises de agrupamento hierárquico mostraram que tais miRNAs foram capazes de discriminar o perfil de expressão das linhagens normais e tumorais (**figura 6**).

Tabela 3. miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens normais e tumorais

miRNAs	<i>Fold Change</i>
hsa-miR-196b	- 22.6
hsa-miR-202	- 5.6
hsa-miR-452	- 7110.1
hsa-miR-494	- 3.1
hsa-miR-520b	- 17.5
hsa-miR-615-5p	- 15.4

* *Fold Change*: Número de vezes de diferença de expressão entre as linhagens tumorais e normais. Esse valor foi obtido pelo cálculo: $2^{-\Delta CT_{\text{tumorais}}} / 2^{-\Delta CT_{\text{normais}}}$, sendo que o sinal negativo representa expressão reduzida nas linhagens tumorais em relação às normais.

Figura 6. Agrupamento hierárquico (*cluster*) dos 6 miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens normais e tumorais. Os miRNAs estão representados nas linhas e nas colunas estão as amostras. A barra localizada na região superior representa a escala de cores.

O banco de dados *miRDB* foi utilizado para verificar a sequência e a localização cromossômica dos miRNAs diferencialmente expressos. Os resultados mostraram que apenas os miR-452 e miR-520b são transcritos a partir de regiões cromossômicas iguais (3p). Com o auxílio dessa ferramenta, também obtivemos o número de potenciais RNAm-alvos correspondentes a cada um desses miRNAs, os quais variaram de 84 (miR-615-5p) a 654 (miR-452) (**tabela 4**). Com a finalidade de identificar os transcritos-alvo, comparamos os resultados de predição obtidos por diferentes bancos de dados: *MicroCosmo*, *PITA*, *PicTar*, *TargetScan* e *miRBase*. Foram considerados alvos válidos aqueles comumente preditos por, no mínimo, dois desses bancos, sendo eles: HOXC8, PTEN, IGF2, IGF1R e SMAP1.

Tabela 4. Características dos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais e normais

miRNAs	Cromosomo	Sequência 5' - 3'	n° RNAm-alvo	Banco de dados	RNAm-alvo
hsa-miR-196b	7q	uagguaguuuuccuguuguuggg	177	PicTar, MicroCosm, miRBase	HOXC8
hsa-miR-202	10q	Agagguauagggaugggaa	204	microCosm, TargetScan e miRBase	SMAP1, STARD13
hsa-miR-452	3p	aaugacacgaucacucccguga	654	TargetSca, MirBase e MicroCosm	VEGF, IGF1R
hsa-miR-494	14q	ugaaacauacacgggaaccuc	494	miRBase, TargetScan	PTEN, ROCK1
hsa-miR-520b	3p	Aaagugcuuccuuuagaggg	512	miRBase, TargetScan	NR4A2, ITGB3
hsa-miR-615-5p	12q	gggggucucccgugcucggauc	84	TargetScan, microCosm	IGF2

* 1: Dados obtidos pelo banco de dados *miRDB*: Cromossomo = Localização genômica das regiões a partir das quais são transcritos os miRNAs diferencialmente expressos correspondentes aos miRNAs; Sequência 5' - 3': sequência correspondente ao miRNA maduro.

*2: Bancos de dados: Ferramentas utilizadas para a predição dos RNAm-alvos de cada miRNA.

4.5. Resultados da expressão de miRNAs em tumores

4.5.1. Análises estatísticas

A análise estatística pelo teste ANOVA mostrou 246 miRNAs diferencialmente expressos entre os três grupos de amostras: normal, familiar e não-familiar. Em seguida, o teste-T permutado (FDR 5%) foi utilizado apenas para esse conjunto de miRNAs, com o objetivo de situá-los em cada comparação de amostras: familiar vs normal; não-familiar vs normal; familiar vs não-familiar. Foram excluídos da análise 13 miRNAs que apresentaram baixo nível de detecção ($C_T > 39$) em mais de 60% do total de cada grupo de amostras em questão. Foram obtidos 137 miRNAs diferencialmente expressos na comparação familiar vs normal, sendo que todos eles apresentaram expressão reduzida no grupo familiar em relação ao normal (**Anexo A**). Entre os grupos não-familiar e normal, foram obtidos 44 miRNAs diferencialmente expressos dos quais 42 eram comuns a comparação normal vs familiar, sendo que a maioria apresentou expressão reduzida no grupo não-familiar comparado ao normal, exceto dois deles (miR-499-3p e miR-510), que apresentaram maior expressão no grupo tumoral em relação ao normal (**Anexo B**). Na comparação familiar vs não-familiar, foram obtidos apenas 4 miRNAs, sendo que todos eles apresentaram menor expressão no grupo familiar comparado ao não-familiar.

4.5.2. Agrupamento hierárquico

Com o objetivo de verificar se os miRNAs diferencialmente expressos eram capazes de discriminar o perfil de expressão entre os grupos de cada comparação, os dados foram submetidos ao agrupamento hierárquico, com o auxílio do programa Mev. Na **figura 7**, é possível observar que os 137 miRNAs de expressão diferencial entre os tumores familiares e as amostras normais separaram esses dois grupos de forma eficaz.

Figura 7. Representação do agrupamento hierárquico de alguns dos 137 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos familiar e normal. Os parâmetros utilizados foram distância euclidiana como métrica e *average linkage* como medida de semelhança. O dendrograma foi construído baseando-se nos valores normalizados ($2^{-\Delta CT}$) de expressão de cada miRNA em todas as amostras de cada grupo. As amostras, dispostas em colunas, estão especificadas pelo seu código, seguidas pelos sufixos TF (tumores familiares) e N (amostras normais). Os nomes dos miRNA estão dispostos em linhas. A barra localizada na região superior representa a escala de cores para os miRNAs de expressão reduzida (verde) correspondente aos tumores familiares e para os de alta expressão (vermelho), relacionados às amostras normais.

A **figura 8** mostra o mesmo tipo de análise para os 44 miRNAs obtidos na comparação não-familiar vs normal, na qual é possível observar que esse grupo de miRNAs foi capaz de distinguir os tumores não-familiares das amostras normais.

Figura 8. Representação do agrupamento hierárquico de alguns dos 44 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos não-familiar vs normal. Os parâmetros utilizados foram distância euclidiana como métrica e *average linkage* como medida de semelhança. O dendrograma foi construído baseando-se nos valores normalizados ($2^{-\Delta CT}$) de expressão de cada miRNA em todas as amostras de cada grupo. As amostras, dispostas em colunas, estão especificadas pela seu código, seguidas pelos sufixos TNF (tumores não-familiares) e N (amostras normais). Os nomes dos miRNA estão dispostos em linhas. A barra localizada na região superior representa a escala de cores para os miRNAs de expressão reduzida (verde) correspondente aos tumores não-familiares e para os de alta expressão (vermelho), relacionados às amostras normais.

Diferentemente das demais comparações, os 4 miRNAs encontrados como diferencialmente expressos nos tumores familiares comparados aos não-familiares não foram capazes de discriminar o perfil de expressão entre os dois grupos, visto que 8 dos 20 tumores não-familiares situaram-se dentro do grupo correspondente aos tumores familiares (figura 9).

Figura 9. Representação do agrupamento hierárquico de alguns dos 44 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos não-familiar vs normal. Os parâmetros utilizados foram distância euclidiana como métrica e *average linkage* como medida de semelhança. O dendrograma foi construído baseando-se nos valores normalizados ($2^{-\Delta CT}$) de expressão de cada miRNA em todas as amostras de cada grupo. As amostras, dispostas em colunas, estão especificadas pela seu código, seguidas pelos sufixos TNF (tumores não-familiares) e TF (tumores familiares). Os nomes dos miRNA estão dispostos em linhas. A barra localizada na região superior representa a escala de cores para os miRNAs de expressão reduzida (verde) correspondente aos tumores não-familiares e para os de alta expressão (vermelho), relacionados às amostras normais.

4.5.3. miRNAs exclusivos/comuns entre comparações

Os resultados obtidos em cada análise foram comparados entre si com o objetivo de verificar os miRNAs comuns e exclusivos entre as comparações, o que permitiu a construção do *Diagrama de Venn*, representado na **figura 10**. Nesse gráfico, é possível observar que apenas as comparações familiar vs normal e não-familiar vs normal apresentaram miRNAs comuns entre si (42 miRNAs).

Figura 10. Diagrama de Venn mostrando o número de miRNAs comuns/exclusivos entre as três comparações: familiar vs normal; não-familiar vs normal; familiar vs não-familiar.

Considerando os valores de *fold* de cada um dos 42 miRNAs (**figura 11**), foi visto que, apesar de ocorrer na mesma direção, a magnitude da redução de expressão desses miRNAs em relação ao grupo normal foi aparentemente mais prevalente no grupo familiar em comparação ao não-familiar, com exceção de apenas 5 miRNAs (miR-let-7b,c,d; miR-205; miR-423-5p).

Figura 11. Representação gráfica dos valores de *fold* dos 42 miRNAs comuns entre as comparações familiar vs normal e não-familiar vs normal. As barras representam os valores da razão: $2^{-\Delta CT}$ familiar/ $2^{-\Delta CT}$ normal (azul) e $2^{-\Delta CT}$ não-familiar/ $2^{-\Delta CT}$ normal (vermelho).

4.5.4. Seleção dos miRNAs para validação

Com o objetivo de validar os resultados, foram obtidas 7 amostras tumorais independentes (3 com história familiar e 4 sem história familiar), cujas características clínico-patológicas estão mostradas na **tabela 5**.

Tabela 5. Dados das pacientes incluídas na validação.

Idade	Grau	TNM	Característica	CA mama familiar	ER	PR	HER-2	BRCA 1 (+/-)	BRCA 2 (+/-)
29	/-/	I	Luminal A	NCCN	POS	POS	NEG	não	não
33	/-/	IIA	Luminal B	NÃO	POS	NEG	POS	não	não
26	GN3 GH2	IIIA	Luminal B	NÃO	POS 5%	POS 10%	POS	não	não
28	GN3 GH3	IIIB	Trip. Neg	NCCN	NEG	NEG	NEG	não	não
22	GN3 GH2	IIA	Her-2	NCCN	NEG	NEG	POS+++	não	não
24	GN3 GH3	IIIA	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG	não	não
34	GH2	IIIA	Luminal A	NÃO	POS	POS	NEG	não	não

43

*1: CA = Câncer; POS = positivo; NEG = negativo; Trip. NEG = triplo negativo; CDI = câncer ductal invasivo; GN = grau nuclear; GH = grau histológico; ER = receptor de estrógeno; PR = progesterona; HER-2 = receptor de fator de crescimento tipo 2; NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*.

*2: A classificação dos tumores foi feita de acordo com o modelo proposto por Carey e colaboradores (2006): subtipo luminal A (ER⁺ e/ou PR⁺ e HER-2⁻); subtipo luminal B (ER⁺ e/ou PR⁺ e HER-2⁺); subtipo HER-2 superexpresso (HER-2⁺ e ER⁻/PR⁻) e subtipo triplo negativo (ER⁻/PR⁻/HER-2⁻).

*3: Os tumores também foram classificados em estadios de acordo com as recomendações do sistema TNM, sugeridas pelo Sub-Comitê de Registros de Casos de Câncer e Apresentação Estatística, da Organização Mundial da Saúde (OMS): I (T1N0M0); IIA (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0); IIB (T2N1M0,T3N0M0); IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0); IIIB (T4N0M0,T4N1M0, T4N2M0); IV (qualquer T, qualquer N e M1).

Dentre os 137 miRNAs de expressão diferencial nos tumores familiares em relação aos normais, foram selecionados 18 miRNAs exclusivos da comparação entre os dois grupos (**tabela 6**).

Tabela 6. 18 miRNA diferencialmente expressos (*Fold Change*) entre o grupo familiar vs normal.

miRNAs	<i>Fold change</i>	
hsa-miR-100	-15.10	
hsa-miR-125b	-15.38	
hsa-miR-126	-9.40	
hsa-miR-133a	-64.98	
hsa-miR-145	-21.62	
hsa-miR-181a	-26.20	
hsa-miR-185	-16.58	
hsa-miR-195	-5.30	
hsa-miR-199a-5p	-20.34	
hsa-miR-221	-4.86	
hsa-miR-27b	-9.31	
hsa-miR-29a	-6.09	
hsa-miR-330-3p	-137.25	
hsa-miR-365	-13.64	
hsa-miR-486-5p	-2102.66	
hsa-miR-518b	-14652.34	44
hsa-miR-618	-33.70	
hsa-miR-98	-4567.00	

* Valores de *Fold Change* dos 18 miRNAs de expressão reduzida no grupo familiar comparado ao grupo normal. O cálculo desses valores foi realizado usando a razão entre os valores $2^{-\Delta CT}$ familiar/ $2^{-\Delta CT}$ normal.

RESULTADOS

O perfil de expressão dos 18 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos familiar e normal foi representado pela construção de gráficos *Box Plot* (**figura 12**), os quais permitem confirmar a expressão reduzida de cada miRNA nos tumores familiares comparados às amostras normais.

Figura 12. (Gráficos *Box Plot* representativos dos valores de expressão normalizados dos grupos familiar (TF) e normal (N). A construção dos gráficos foi realizada pelo programa estatístico R, baseando-se na mediana dos valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$) obtidos entre os pacientes de cada grupo, assim como nos valores máximo e mínimo encontrados.

A seleção para a validação dos miRNAs diferencialmente expressos nos tumores não-familiares em relação às amostras normais incluiu os 2 miRNAs exclusivos dessa comparação, cujos valores de *fold* estão apresentados na **tabela 7**.

Tabela 7. miRNAs exclusivos da comparação não-familiar vs normal.

miRNAs	<i>Fold change</i>
hsa-let-7e	-7.286
hsa-miR-31	-4.893

* Valores de *Fold Change* dos 2 miRNAs exclusivos da comparação não-familiar vs normal. O cálculo desses valores foi realizado usando os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$: razão entre os valores $2^{-\Delta CT}$ não-familiar/ $2^{-\Delta CT}$ normal.

Em relação à comparação familiar vs não-familiar, escolhemos para validação todos os miRNAs encontrados como diferencialmente expressos entre esses dois grupos (**tabela 8**).

Tabela 8. miRNAs diferencialmente expressos entre o grupo familiar vs não-familiar.

miRNAs	<i>Fold change</i>
hsa-miR-107	-53.89
hsa-miR-124	-1135.79
hsa-miR-129-3p	-3139.34
hsa-miR-518e	-799.09

* Valores de *Fold Change* dos 4 miRNAs de expressão reduzida no grupo familiar em relação ao não-familiar. O cálculo desses valores foi realizado usando a razão entre os valores $2^{-\Delta CT}$ familiar/ $2^{-\Delta CT}$ não-familiar.

A **figura 13** mostra o perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos nos tumores familiares em relação aos não-familiares. Os gráficos *Box Plot* mostram, conforme apresentado na tabela 8, que tais miRNAs têm a expressão reduzida no grupo familiar em relação ao não-familiar.

Figura 13. Gráficos *Box Plot* representativos dos valores de expressão normalizados ($2^{-\Delta CT}$) dos grupos familiar (TF) e não-familiar (TNF). A construção dos gráficos foi realizada pelo programa estatístico R, baseando-se na mediana dos valores de expressão obtidos entre os pacientes de cada grupo assim como nos valores máximo e mínimo encontrados.

4.5.5. Validação dos resultados

Os resultados da validação dos miRNAs selecionados na comparação familiar vs normal podem ser observados na **tabela 9**. Dentre os 18 miRNAs selecionados, 12 foram validados (negrito). Os outros 6 miRNAs não foram validados, visto que apareceram como super-expressos no grupo familiar em relação ao grupo normal (valor de *fold* positivo). Portanto, 67% dos dados obtidos pela metodologia *TaqMan microRNA Assay* puderam ser validados.

Tabela 9. Validação dos resultados obtidos na comparação familiar vs normal

miRNAs	<i>Fold TaqMan microRNA Assay</i> ($2^{-\Delta Ct}$)	<i>Fold validação</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
hsa-miR-100	-15.1	-2.06
hsa-miR-125b	-15.38	-2.57
hsa-miR-126	-9.4	-1.74
hsa-miR-133a	-64.98	-9.11
hsa-miR-145	-21.62	-1.06
hsa-miR-181a	-26.20	4.50
hsa-miR-185	-16.58	-2.36
hsa-miR-195	-5.30	1.24
hsa-miR-199a-5p	-20.34	-2.40
hsa-miR-221	-4.86	1.36
hsa-miR-27b	-9.31	4.13
hsa-miR-29a	-6.09	-1.58
hsa-miR-330-3p	-137.25	-1.22
hsa-miR-365	-13.64	2.25
hsa-miR-486-5p	-2102.66	-42.22
hsa-miR-518b	-14652.34	-3.29
hsa-miR-618	-33.70	-1.94
hsa-miR-98	-4567.00	3.03

* Valores de *fold* obtidos pela metodologia *Fold TaqMan microRNA Assay* e pelos experimentos de validação para a comparação familiar vs normal. O cálculo dos valores da validação foi realizado usando os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$: razão entre os valores $2^{-\Delta Ct}$ familiar/ $2^{-\Delta Ct}$ normal.

Os resultados da validação dos 2 miRNAs exclusivos da comparação não-familiar vs normal e exclusivos estão demonstrados na **tabela 10**. É possível observar que ambos os miRNAs apresentaram expressão reduzida no grupo não-familiar em relação ao normal por ambas as metodologias, indicando 100% de validação.

Tabela 10. Validação dos miRNAs exclusivos da comparação não-familiar vs normal

miRNAs	FOLD <i>TaqMan microRNA Assay</i> ($2^{-\Delta Ct}$)	FOLD Validação ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
hsa-let-7e	-7.29	-1.55
hsa-miR-31	-4.89	-3.52

* Valores de *fold* obtidos pela metodologia *Fold TaqMan microRNA Assay* e pelos experimentos de validação para a comparação familiar vs normal. O cálculo dos valores da validação foi realizado usando os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$: razão entre os valores $2^{-\Delta Ct}$ não-familiar/ $2^{-\Delta Ct}$ normal.

Os resultados da **tabela 11** mostram que todos os miRNAs que apresentaram expressão reduzida no grupo familiar em relação ao não-familiar após a realização da metodologia *TaqMan microRNA Assay* também apresentaram a mesma tendência durante os experimentos de validação e, portanto, a validação para os resultados dessa comparação foi de 100%.

Tabela 11. Validação dos miRNAs obtidos na comparação não-familiar vs normal

miRNAs	FOLD <i>TaqMan microRNA Assay</i> ($2^{-\Delta Ct}$)	FOLD Validação ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
hsa-miR-107	-53.9	-1.36
hsa-miR-124	-1135.8	-5.11
hsa-miR-129-3p	-3139.3	-1.49
hsa-miR-518e	-799.1	-3.57

* Valores de *fold* obtidos pela metodologia *Fold TaqMan microRNA Assay* e pelos experimentos de validação para a comparação familiar vs normal. O cálculo desses valores foi realizado usando os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$: razão entre os valores $2^{-\Delta Ct}$ familiar/ $2^{-\Delta Ct}$ não-familiar.

4.5.6. Confirmação dos resultados *in silico*

A predição de alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em cada comparação foi realizada pela ferramenta miRBD, o que resultou em 1 a 1009 RNAm-alvos associados a cada miRNA. Apenas os dados validados foram submetidos às análises de predição. Assim, selecionamos apenas os 12 miRNAs de expressão diferencial validada entre os tumores familiares e as amostras normais. Conforme demonstrado na **tabela 12**, o miR-330-3p apresentou o maior número de transcritos-alvo (764 mRNAs) enquanto que o miR-126 demonstrou o menor número (10 mRNAs). Além disso, alguns dos 12 miRNAs estão localizados no mesmo cromossomo 11q (miR-100 e miR-125b). De forma similar às análises realizadas para as linhagens, a identificação desses alvos foi realizada por diferentes bancos de dados (*MicroCosmo*, *PITA*, *PicTar*, *TargetScan* e *miRBase*), sendo considerados válidos apenas os resultados encontrados por, no mínimo, dois desses bancos. Dentre esses alvos, é interessante notar a presença do transcrito-alvo relacionado à enzima DICER, envolvida na biogênese dos miRNAs.

Tabela 12. Predição de alvos dos miRNAs exclusivos da comparação familiar vs normal.

miRNAs	Cromosomo	Localização	Sequência 5'-3'	n° RNAm-alvo	Banco de dados	RNAm-alvos
hsa-miR-100	q11	intergênica	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	22	microCosm, PITA	FRAP1, STAT5B, RASGRP3, IGF1R
hsa-miR-125b	q11	intergênica	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	202	miRBase, PITA	MAP3K11, DICER, BCL2, ERBB2
hsa-miR-126	9q	intrônica	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	10	miRBase, PITA	PIK3R2, IL21R, SOX2
hsa-miR-133a	18q	intrônica	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	214	microCosm, PITA	Bcl2, RAP2c
hsa-miR-145	5q	intergênica	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	503	MiRBase, PITA	ITGB3, XRN1
hsa-miR-185	22q	intrônica	UGGAGAGAAAGGCAGUUC	380	microCosm, PITA	Six1, MAPK13
hsa-miR-199a-5p	19p	intrônica	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	244	TargetScan, microCosm e miRBase	RASF2, MP3K
hsa-miR-29a	7q	intergênica	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	366	TargetScan, PITA	ARL3, ANXA2
hsa-miR-330-3p	19q	intrônica	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	764	miRBase, PITA	IRX2, GRB10
hsa-miR-486-5p	8p	intrônica	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	159	TargetScan, miRBase, PITA	PTEN, FOXO1
hsa-miR-518b	19q	intergênica	CAAAGCGCUCCCCUUAGAGGU	47	miRBase, PITA	RAP1B, CPEB1
hsa-miR-618	12q	intrônica	AAACUCUACUUGUCCUUCUGAGU	311	miRBase, PITA	IGFB5, RAB11F

1: Dados obtidos pelo banco de dados *miRDB*: Cromossomo = Localização genômica das regiões a partir das quais são transcritos os miRNAs diferencialmente expressos correspondentes aos miRNAs; Sequência 5' - 3': sequência correspondente ao miRNA maduro.

*2: Bancos de dados: Ferramentas utilizadas para a predição dos RNAm-alvos de cada miRNA.

De acordo com a **tabela 13**, os miRNAs exclusivos da comparação não-familiar vs normal apresentaram de 184 RNAm-alvos (miR-let-7e) a 247 RNAm-alvos (miR-31).

Tabela 13. Predição de alvos dos miRNAs da comparação não-familiar vs normal

miRNAs	Cromosomo	Localização	Sequência 5' - 3'	nº RNAm-alvo	Banco de dados	RNAm-alvos
hsa-let-7e	19q	intergênica	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	184	miRBase, TargetScan	RAS, HMGA2
hsa-miR-31	9p	intrônica	GGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG	247	microCosm, PITA	RhoA, ITGAV

1: Dados obtidos pelo banco de dados *miRDB*: Cromossomo = Localização genômica das regiões a partir das quais são transcritos os miRNAs diferencialmente expressos correspondentes aos miRNAs; Sequência 5' - 3': sequência correspondente ao miRNA maduro.*2: Bancos de dados: Ferramentas utilizadas para a predição dos RNAm-alvos de cada miRNA.

Em relação à comparação entre tumores familiares e não-familiares, o miR-518e mostrou o maior número de transcritos-alvo (481 mRNAs) e o miR-124 apresentou o menor número (26 mRNAs) (**tabela 14**). A confiabilidade da predição destes alvos no banco de dados miRBase é dada pelo alinhamento do miR-107 com seus transcritos-alvos. A **figura 14** mostra a complementariedade da região 5' do miR-107 com a região 3'UTR dos transcritos-alvos (PTEN e AKT).

Tabela 14. Predição de alvos dos miRNAs da comparação familiar vs não-familiar

miRNAs	Cromo- ssomo	localidade	Sequencia	n° genes alvos	Banco de dados	Gene alvo
miR-107	10q	intronic	AGCAGCAUUG UACAGGGCUA UCA	388	miRBase, PITA, PicTar	PTEN, AKT, RAS, DICER
miR-129-3p	11p	intergenica	AAGCCCUUACC CCAAAAAGCAU	188	TargetScan, miRBase, PITA	IGF2BP1, SMAD3, MAP3K, RAS, BCL2
miR-518e	19q	intergenica	AAAGCGCUUCC CUUCAGAGUG U	481	TargetScan, PITA	RAP1B
miR-124	8p	intergenica	UAAGGCACGC GGUGAAUGCC	26	PITA, PicTar, MicroCOsm	SLC16A, ITGB1, NR3C1

1: Dados obtidos pelo banco de dados *miRDB*: Cromossomo = Localização genômica das regiões a partir das quais são transcritos os miRNAs diferencialmente expressos correspondentes aos miRNAs; Sequência 5' - 3': sequência correspondente ao miRNA maduro.*2: Bancos de dados: Ferramentas utilizadas para a predição dos RNAm-alvos de cada miRNA.

hsa-miR-107/PTEN Alignment

3' acUAUCGGGACAUGUUACGACGa 5' hsa-miR-107 : : : 1067:5' auAAAAUAUUUUGUAAUGCUGCa 3' PTEN	Alignment score: 157.0 PhastCons score: 0.666113 Energy: 0.0
---	--

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/PTEN alignment.

PTEN phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1) ☐ Click to hide non-highlighted miRNAs

1067:hsa-miR-107	1107:hsa-miR-518c
1067:hsa-miR-103	1091:hsa-miR-216a
1055:hsa-miR-590-3p	1090:hsa-miR-1183
1123:hsa-miR-125b-1	
1051 UUUUUUCUCAUUAAAAUAUUUUUGUAAUGCUGCACAGAAAUUUUCAAUUUGAGAUAUCUACAGUAAGCGUU 1125	

hsa-miR-107/AKT3 Alignment

3' acuAUCGGGA----CAUGU-UACGACGa 5' hsa-miR-107 : : : 1203:5' auuUGGCUUUGGGAGAAAGAGAUGCUGCc 3' AKT3	Alignment score: 142.0 PhastCons score: 0.642436 Energy: 0.0
--	--

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/AKT3 alignment.

AKT3 v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma) ☐ Click to hide non-highlighted miRNAs

1203:hsa-miR-107	1255:hsa-miR-153
1203:hsa-miR-103	1247:hsa-miR-1290
1201 GAAUUUGGCUUUGGGAGAAAGAGAUGCUGCCAUUUUAACCCCUUGGUACUGAAAAUGAGAAAAUCCCCAACUAUGCA 1275	

Figura 14. Alinhamento da sequência 5' do miR-107 com as sequências 3'UTR dos mRNAs correspondentes aos genes PTEN e AKT3, preditos como alvo pelo banco de dados miRBase.

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama em mulheres jovens possui comportamento agressivo, sendo diagnosticado em estádios mais avançados da doença (El Saghir *et al.*, 2006). Os mecanismos moleculares que levam a esse tipo de câncer não estão bem esclarecidos, principalmente no caso de pacientes não-portadoras de mutação nos genes BRCA1/2. Considerando o envolvimento dos miRNAs no comportamento de diversos tipos de câncer (Kondo *et al.*, 2008), no presente estudo, decidimos avaliar o perfil de expressão de miRNAs por RT-PCR em tempo real em carcinomas mamários provenientes de pacientes jovens (com e sem história familiar), com o objetivo de verificar a possível participação dessas moléculas no desenvolvimento desses tumores.

Com o intuito de avaliar a confiabilidade dos dados gerados por essa metodologia, decidimos realizar, primeiramente, o estabelecimento do perfil de expressão diferencial de miRNAs em duas linhagens tumorais mamárias (MDA-MB-231 e MCF-7) comparadas a duas linhagens normais (Hb4a e MCF-10a). Os nossos resultados mostraram uma clara separação entre linhagens normais e tumorais e de forma geral, mostraram a expressão reduzida de 6 miRNAs nas linhagens tumorais comparadas às normais, sendo que tais dados mostraram-se concordantes com a literatura: no trabalho de Li e colaboradores (2010), a linhagem MDA-MB-231 foi utilizada para demonstrar o potencial papel supressor de tumor do miR-196b, possivelmente pela repressão da ação do gene HOXC8 (Li *et al.*, 2010); o miR-452 foi descrito como indicador de comprometimento linfonodal (T2 e T3) em carcinoma de ureter (Veerla *et al.*, 2009); os miR-202 e miR-520b foram descritos, respectivamente, em leucemias e células-tronco (Pizzimenti *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009); o miR-494 possui como alvo o gene PTEN (supressor tumoral) em célula epitelial de brônquio (Liu *et al.*, 2009). As raras evidências do envolvimento desses miRNAs no desenvolvimento do câncer de mama indicam que o perfil de expressão dessas 6 moléculas ainda não foi suficientemente investigado no tecido mamário.

Considerando as amostras de pacientes, a expressão diferencial dos miRNAs nos tumores de pacientes com histórico familiar exibiu uma redução da expressão de todos os miRNAs encontrados como diferencialmente expressos em relação às amostras normais. Como os miRNAs geralmente têm atividade repressora sobre seus alvos transcricionais, tais dados sugerem que os RNAm-alvos dos miRNAs dessa comparação apresentam-se super-expressos. A expressão reduzida dos miR-126, miR-185, miR-125b, miR-133a, miR-98, miR-486-5p e miR-100 em câncer de mama foi previamente detectada por alguns trabalhos, os quais demonstraram sua possível ação como repressores tumorais. A inibição da expressão do miRNA miR-126 na linhagem MDA-MB-231 levou ao surgimento de metástases ósseas, cuja atividade foi reduzida após a indução da expressão desse miRNA (Tavazoie *et al.* 2008). Além disso, alterações na sequência do miR-126, consequentemente sua redução de atividade, estão relacionadas à maior ocorrência de metástases e menor sobrevida em pacientes, com idade de 45 anos, apresentando carcinomas mamários com história familiar e não-portadores de mutação nos genes BRCA1/2 (Yang *et al.*, 2010). No trabalho de Imam e colaboradores (2010), o miR-185 foi descrito como modulador da expressão do gene Six1 (proteína *homeobox*), fortemente relacionado à maior agressividade, aparecimento de metástases e pior prognóstico. Os autores demonstraram que a super-expressão desse miRNA nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 reduziu a expressão de Six1, diminuindo as taxas de migração celular e metástase. A indução na expressão do miR-125b foi associada à diminuição nos níveis de ativação de ERK1/4 e AKT, proteínas mediadoras do crescimento, migração e invasão celulares (Scott *et al.*, 2007). Além disso, Hofmann e colaboradores (2009) sugeriram a importância do miR-125b como alvo na aplicação de novas estratégias terapêuticas, visto que sua super-expressão ocasionou a redução nos níveis de expressão do receptor ErbB2 em linhagens tumorais mamárias, reprimindo os eventos de proliferação e migração relacionados à presença desse receptor. A reduzida expressão do miR-145 também foi demonstrada em tumores de mama comparados a tecidos normais, a qual se correlacionou com as características clínico-patológicas dos pacientes, tais como a presença de ER, PR, estadiamento e proliferação tumorais (Iorio *et*

al., 2005). O miR-100 foi encontrado pouco expresso em alguns cânceres, e descrito em células de ovário como supressor de tumor que influencia diretamente, ou indiretamente nos efeitos da sinalização da via PI3K/AKT/mTOR (Nagaraja *et al.*, 2010). O miR-486-5p já foi descrito com baixa expressão em tumores mamários quando comparados ao tecido normal. Este miRNA foi experimentalmente demonstrado a associação desse miRNA à progressão de glioblastomas (Navon *et al.*, 2009). Apesar de outros miRNAs validados em nosso estudo ainda não terem sido descritos como mediadores no desenvolvimento do câncer de mama, tais moléculas parecem ter papéis importantes na progressão de outros tipos de câncer. Nesse contexto, a redução na expressão do miR-133a também foi relatada nos cânceres de esôfago, pulmão e bexiga, nos quais esse miRNA parece exercer papel supressor pela regulação direta do oncogene FSCN1 (Kano *et al.*, 2010; Chiyomaru *et al.*, 2010; Crawford *et al.*, 2009). O miR-29a regula a expressão de diversos genes relacionados às atividades de proliferação e invasão de linhagens celulares de cérebro e pulmão (Muniyappa *et al.*, 2009). Diferentemente dos miRNAs descritos acima, o miR-199a-5p parece favorecer a progressão de linhagens derivadas de meduloblastomas, visto que, enquanto a sua reduzida expressão pareceu estar relacionada ao comportamento menos agressivo, a alta expressão desse miRNA coincidiu com a atividade metastática dessas células (Garzia *et al.*, 2009). Hoje, ainda existe poucas evidências de outros miRNAs resultantes da comparação do grupo de tumores sem história familiar com o grupo normal, tais como miR-618, miR-518b.

Encontramos apenas 2 miRNAs de expressão reduzida exclusivamente nos tumores não-familiares em relação às amostras normais: o miR-let-7 e o miR-31. A família do miR-let-7 foi bem caracterizada como reguladora da diferenciação e proliferação celular. A alta expressão do miR-let-7 em linhagens tumorais de mama resulta na inibição da expressão de Ras, por interação direta com esse gene ou com o gene HMGA2 (Li *et al.*, 2009). Estudos recentes verificaram que a família do miR-let-7 também pode favorecer a ocorrência de apoptose na linhagem MCF-7 pela inibição da expressão do receptor ER α (Zhao *et al.*, 2010). Interessantemente, o miR-let-7e está relacionado à transição epitélio-mesênquima, o que sugere um tratamento alternativo do câncer de pâncreas pela

super-expressão desse miRNA (Li *et al.*, 2009). A alta expressão de miR-31 tem sido relacionada à sobrevida prolongada e repressão das atividades de migração e metástases de células tumorais de mama (Schmittgen *et al.*, 2010), visto que esse miRNA tem como principais alvos transcritos relacionados à metástase.

Os miRNAs miR-107, miR-129-3p, miR-124 e miR-518e apresentaram expressão reduzida no grupo familiar em relação ao não-familiar, sendo exclusivos dessa comparação. Apesar de pouco descrito no câncer de mama, a expressão aumentada de miR-129-3p foi relacionada ao aumento de proliferação celular em câncer do endométrio (Huang *et al.*, 2009) e também ao processo de morte celular no câncer de bexiga por intermédio dos RNAm-alvos SOX4 e GALNT1 (Dyrskjot *et al.*, 2009). O miR-124 foi descrito principalmente em glioblastoma multiforme derivado de células tronco (Silber *et al.*, 2008), câncer cervical e cérebro, no qual está envolvido na repressão pós-transcricional do gene alvo EfnB1, provocando a diferenciação celular (Wilting *et al.*, 2010). Tais dados têm apoiado a possibilidade de utilização do miR-124 por aplicação exógena como no tratamento alternativo de câncer cerebral (Silber *et al.*, 2010). Diferentemente dos outros miRNAs, a alta expressão do miR-107 parece favorecer a disseminação e migração de células de carcinoma mamário e a transição epitélio-mesênquima. Além disso, este miRNA está associado a maiores índices de metástase e pior prognóstico de pacientes com câncer de mama, o que pode estar relacionado à sua ação direta sobre o aumento do RNAm-alvos (Martello *et al.*, 2010). Podemos especular que nos tumores do grupo não-familiar existe uma maior possibilidade de relacionamento com a transição epitélio-mesênquima.

Poucas evidências foram encontradas para o miR-518e, o qual parece ser específico de tecido placentário humano (Miura *et al.*, 2010). A redução da expressão desses miRNAs pode ocorrer devido a baixa expressão de miRNAs nesses tumores é a possibilidade de alguns miRNAs, como por exemplo o miR-194, estarem exercendo atividade de metilação sob outros miRNAs alterando o perfil de expressão de miRNAs que poderia explicar é a possibilidade de estarem relacionados a progressão neoplásica de mama (Klein ME et al 2007).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou as primeiras evidências do perfil de miRNAs em amostras de carcinoma de mama em pacientes jovens (idade ≤ 35 anos), com ou sem histórico familiar e não-portadoras de mutações nos genes BRCA1/2. Nossos dados demonstraram que os tumores do grupo de pacientes com e sem história familiar apresentaram uma redução global na expressão dos miRNAs, quando comparados às amostras normais. Essa expressão reduzida pode ser explicada por alterações em componentes da maquinaria de biogênese dos miRNAs, como é o caso das proteínas Dicer, Drosha/DGCR8 e Ago2. Além disso, mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidos, uma vez que alguns miRNAs são capazes de metilar sequências responsáveis pela transcrição de outros miRNAs, reprimindo sua expressão. Nossa abordagem experimental identificou:

- (1) 137 miRNAs de expressão reduzida no grupo familiar em relação às amostras normais;
- (2) 44 miRNAs de expressão reduzida nos tumores não-familiares em relação às amostras normais.
- (3) 4 miRNAs de expressão reduzida na comparação familiar vs não-familiar.

Entre as comparações familiar vs normal e não-familiar vs normal foram encontrados em comum 42 miRNAs de expressão diferencial, sendo que a expressão reduzida foi mais prevalente no grupo familiar comparado ao não-familiar. Com o objetivo de verificar os possíveis mecanismos regulatórios distintos entre os dois tipos de tumores, foi realizada a validação considerando os miRNAs exclusivos de cada comparação, além dos miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos familiar e não-familiar. De acordo com a literatura, os

miRNAs de expressão reduzida nas três comparações podem estar envolvidos na regulação de diversos processos tumorais como: proliferação, apoptose e invasão celular. Assim, a predição de RNAm-alvos desses miRNAs pode auxiliar na definição das bases biológicas do câncer de mama em mulheres jovens, levando à melhor compreensão de alguns dos mecanismos moleculares envolvidos com o perfil agressivo desse tipo de tumor. Assim, essa estratégia possibilitaria a realização de terapias alvo-específicas para cada tipo de paciente (com e sem história familiar).

Apoio financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo número de processo 09/10088-7 e nº 2009/02040-4 (bolsa de mestrado). CNPQ (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Atividade científica:

Os resultados parciais obtidos foram apresentados em forma de pôster: na Jornada de Oncologia da FMUSP 2009 e na AACR- American Association Cancer Research - Washington D.C. 2010. O trabalho foi premiado com o *2010 AVON-Schollar-in-training Awards*. (**Adendo**)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anders CK. Acharya CR. Hsu DS. Broadwater G. Garman K. Foekens JA. Zhang Y. Wang Y. Marcom K. Marks JR. Mukherjee S. Nevins JR. Blackwell KL. Potti A. Age- specific differences in oncogenic pathway deregulation seen in human breast tumors. PLoS ONE. 2008; 2;3(1):e1373.

Bartel D.P. MicroRNAs: genomics. biogenesis. mechanism. and function. Cell. 2004;116. 281-297.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. Nat Genet. 2005;37(7):766-70.

Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk R. H, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell. 2005;120(1):21-4.

Bertheau P, Steinberg SM, Cowan K e Merino MJ. Breast cancer in young women: clinic pathologic correlation. Semin Diagn Pathol, 1999 16: 248-56.

Brandt A, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Age of onset in familial breast cancer as background data for medical surveillance. **Br J Cancer, 2010 Jan 5;102(1):42-7. Epub 2009 Nov 10.**

Brennecke J. Stark A. Russell RB. Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol. 2005;3:e85

Cai X, Hagedorn C. H, Cullen B. R. Human microRNAs are processed from capped. polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA. 2004;10:1957-66.

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

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2999–3004.

Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, Fujimura L, Kikkawa N, Seki N, Nakagawa M. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102(5):883-91. Epub 2010 Feb 16.

Crawford M, Batte K, Yu L, Wu X, Nuovo GJ, Marsh CB, Otterson GA, Nana-Sinkam SP. MicroRNA 133B targets pro-survival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 23;388(3):483-9. Epub 2009 Aug 3.

Dalmay T. Identification of genes targeted by microRNAs. **Biochem Soc Trans.** 2008 Dec;36(Pt 6):1194-6. Review.

Dyrskjøt L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, Silahtaroglu AN, Lamy P, Ramanathan R, Fristrup N, Jensen JL, Andersen CL, Zieger K, Kauppinen S, Uhløi BP, Kjems J, Borre M, Orntoft TF. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. **Cancer Res.** 2009 Jun 1;69(11):4851-60.

El Saghir NS, Seoud M e Khalil MK. Charafeddine M. Salem ZK. Geara FB. Shamseddine AI. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. **BMC Cancer**, 2006 Jul 20;**6**:194.

Fernandopulle SM, Cher-Siangang P e Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. **Pathology**. 2006 Jun;**38**(3):219-22.

Foxcroft LM, Evans EB e Porter AJ. The diagnosis of breast cancer in women younger than 40. *Breast*, 2004 13: 297-306.

Gajdos C, Tartter PI, Bleiweiss IJ, Bodian C e Brower ST. Stage 0 to stage III breast cancer in young women. *J Am Coll Surg*, 2000 190: 523-9.

Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, Esposito V, Galeone A, Navas L, Esposito S, Gargiulo S, Fattet S, Donofrio V, Cinalli G, Brunetti A, Vecchio LD, Northcott PA, Delattre O, Taylor MD, Iolascon A, Zollo M. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. **PLoS One**. 2009;**4**(3):e4998. Epub 2009 Mar 24.

Gennarino V. A, Sardiello M, Avellino R, Meola N, Maselli V, Anand S, Cuttillo L, Ballabio A, Banfi S. MicroRNA target prediction by expression analysis of host genes. **Genome Res**. 2009 Mar;**19**(3):481-90. Epub 2008 Dec 16.

Gonzalez-Angulo AM. Broglio K. Kau SW. Eralp Y. Erlichman J. Valero V. Theriault R. Booser D. Buzdar AU. Hortobagyi GN. Arun B. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. **Cancer**. 2005 Jun 15;**103**(12):2466-72.

Griffiths-Jones S, Grocock R. J, van Dongen S., Bateman A e Enright A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *NAR* 2006 34(Database Issue):D140-D144

Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, Zhang Y, Paranjape T, Zhu Y. microRNA miR-196a-2 and Breast Cancer: A Genetic and Epigenetic Association Study and Functional Analysis. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5970-7. Epub 2009 Jun 30.

Huang YW, Liu JC, Deatherage DE, Luo J, Mutch DG, Goodfellow PJ, Miller DS, Huang TH. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer Res.* 2009 Dec 1;69(23):9038-46. Epub 2009 Nov 3.

Hutvagner G, Zamore P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science.** 2002 Sep 20;297(5589):2056-60. Epub 2002 Aug 1.

Imam Js, Buddavarapu K, Lee-Chang JS, Ganapathy S, Camosy C, Chen Y e Rao MK. MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene* 2010 May. 1-9.

Iorio M. V, Ferracin M, Liu C. G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo J. P, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin G. A, Querzoli P, Negrini M e Croce C. M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7065-70

Joslyn SA. Radiation therapy and patient age in the survival from early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999 44: 821-6.

Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Matsubara H. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma.. *Int J Cancer.* 2010 Mar 2.

Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. **Nat Genet.** 2007 Oct;**39(10):1278-84**. Epub 2007 Sep 23.

Klein ME, Liou DT, Ma L, Impey S, Mandel G, Goodman RH. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci.* 2007 Dec;**10(12):1513-4**. Epub 2007 Nov 11.

Kondo Naoto, Tatsuya Toyama, Hiroshi Sugiura, Yoshitaka Fujii e Hiroko Yamashita. miR-206 Expression Is Down-regulated in Estrogen Receptor α -Positive Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2008;**68(13):5004–8**

Kraut-Cohen J. Muller WJ. Elson A. Protein-tyrosine phosphatase epsilon regulates Shc signaling in a kinase-specific manner: increasing coherence in tyrosine phosphatase signaling. *J Biol Chem.* 2008 Feb 22;**283(8):4612-21**. Epub 2007 Dec 19.

Lakhani SR. Van De Vijver MJ. Jacquemier J. Anderson TJ. Osin PP. McGuffog L. Easton DF. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor. progesterone receptor. HER-2. and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. **J Clin Oncol.** 2002 May 1;**20(9):2310-8**.

Laloo F. Varley J. Moran A. Ellis D. O'dair L. Pharoah P. Antoniou A. Hartley R. Shenton A. Seal S. Bulman B. Howell A. Evans DG. BRCA1. BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. **Eur J Cancer.** 2006 May;**42(8):1143-50**. Epub 2006 Apr 27.

Lau N.C, Lim L.P, Weinstein E. G. Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001. 294:858–862.

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

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

Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M, Huang S. Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. **Cancer Res. 2010 Oct 15;70(20):7894-904. Epub 2010 Aug 24.**

Li Y, VandenBoom TG 2nd, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, Sarkar FH. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. **Cancer Res. 2009 Aug 15;69(16):6704-12. Epub 2009 Aug 4.**

Liu L, Jiang Y, Zhang H, Greenlee AR, Han Z. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Life Sci*. 2010 Jan 30;86(5-6):192-8. Epub 2009 Dec 16.

Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. **JAMA. 1998 Mar 25;279(12):922-9.**

Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Biciato S, Piccolo S. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1195-207.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell. 2002 Sep 6;110(5):563-74.**

Michael M. Z., O'Connor. S. M., van Holst Pellekaan. N. G., Young. G. P. & James. R. J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 2003: 1; 882–891.

Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem.* 2010 Nov;56(11):1767-71. Epub 2010 Aug 20.

Morrison T. B, Weis J. J, Wittwer C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998 Jun;24(6):954-8, 960, 962.

Muniyappa MK, Dowling P, Henry M, Meleady P, Doolan P, Gammell P, Clynes M, Barron N. MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines. **Eur J Cancer. 2009 Nov;45(17):3104-18. Epub 2009 Oct 7.**

Nagaraja A.K, Creighton C. J, Yu Z, Zhu H, Gunaratne P. H, Reid J. G, Olokpa E, Itamochi H, Ueno N. T, Hawkins S. M, Anderson M. L, Matzuk M. M. A link between miR-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer. *Mol Endocrinol.* 2010, 24:447-463 , Jan 15.

Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A, Yakhini Z. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One.* 2009 Nov 25;4(11):e8003.

Negrini M, Calin G. A. Breast cancer metastasis: a microRNA story. **Breast Cancer Res. 2008;10(2):203. Epub 2008 Mar 26.**

Nelson. P. T. et al. Microarray-based. high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nature Methods* 2004; 1. 155-161.

Olena A. F, Patton J. G. Genomic Organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* 222: 540–545. 2010

Pasquinelli A. E, Reinhart B. J, Slack F, Martindale M. Q, Kuroda M. I, Maller B. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.

Pizzimenti S, Ferracin M, Sabbioni S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, Negrini M, Barrera G. MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. **Free Radic Biol Med.** 2009 Jan 15;**46(2):282-8. Epub 2008 Oct 30.**

Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. **J Transl Med.** 2009 Mar 23;**7:20.**

Ricarte-Filho J. C, Fuziwara C. S, Yamashita A. S, Rezende E, da Silva M. J, Kimura ET. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. *Transl Oncol* 2009 Dec; (2): 236-41

Schmittgen TD. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. **Future Oncol.** 2010 Jan;**6(1):17-20.**

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M. e Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006; 7:3.

Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1479-86. Epub 2006 Nov 16.

Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F and Mo Y-Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007; 26: 2799–2803.

Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. **BMC Med**. 2008 Jun 24;6:14.

Sidoni A, Cavaliere A, Bellezza G, Scheibel M e Bucciarelli E. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. **Breast**. 2003 Aug;12(4):247-50.

Silveri L, Tilly G, Vilotte J. L e Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. *Reprod Nutr*. 2006;46(5):549-56.

Sirotkin A. V, Lauková M, Ovcharenko D, Brenaut P, Mlyncek M. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol*. 2010 Apr;223(1):49-56.

Stahlhut Espinosa C E, Slack F. J. The role of microRNA in Cancer. *Yale J Biol Med*. 2006 Dec;79(3-4):131-40. Review.

Stamps AE 3rd. Of time and preference: temporal stability of environmental preferences. **Percept Mot Skills**. 1997 Dec;85(3 Pt 1):883-96.

Tan Y, Zhang B, Wu T, Skogerbø G, Zhu X, Guo X, He S, Chen R. Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC Molecular Biology* 2009. 10:12

Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. **Nature**. 2008 Jan 10;451(7175):147-52.

Ullmannova V, Popescu NC. Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors. **Int J Oncol**. 2006 Nov;29(5):1127-32.

Veerla S, Lindgren D, Kvist A, Frigyesi A, Staaf J, Persson H, Liedberg F, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Månsson W, Rovira C, Höglund M. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer*. 2009 May 1;124(9):2236-42.

Walker RA, Lees E, Webb MB e Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer*. 1996 Dec;74(11):1796-800.

Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. **J Cell Mol Med**. 2009 Jan;13(1):12-23.

Wiltig SM, van Boerdonk RA, Henken FE, Meijer CJ, Diosdado B, Meijer GA, le Sage C, Agami R, Snijders PJ, Steenbergen RD. Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. **Mol Cancer**. 2010 Jun 26;9:167.

Wolff T, Guirguis-Blake J, Miller T, Gillespie M, Harris R. Screening For Asymptomatic Carotid Artery Stenosis. **Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2007 Dec**.

Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2588-92.

Yoshida K e Miki M: Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 2004, 95:866-871.

Young J. Ménétrey J. Goud B. RAB6C is a retrogene that encodes a centrosomal protein involved in cell cycle progression. **J Mol Biol.** 2010 Mar 19;397(1):69-88.

Yu F. Deng H. Yao H. Liu Q. Su F. Song E. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2010 May 24. [Epub ahead of print]

Yang R, Dick M, Marme F, Schneeweiss A, Langheinz A, Hemminki K, Sutter C, Bugert P, Wappenschmidt B, Varon R, Schott S, Weber BH, Niederacher D, Arnold N, Meindl A, Bartram CR, Schmutzler RK, Müller H, Arndt V, Brenner H, Sohn C, Burwinkel B. Genetic variants within miR-126 and miR-335 are not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat.** 2010 Nov 3.

Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. **Am J Pathol.** 2010 Mar;176(3):1058-64. Epub 2010 Jan 14. Review.

[Zhao J. J.](#), [Lin J.](#), [Yang H.](#), [Kong W.](#), [He L.](#) e [Ma X.](#) [Coppola D.](#) [Cheng JO.](#) MicroRNA-221/222 negatively regulates ER α and associates with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem*. 2008. [Epub ahead of print].

Zhao Y, Deng C, Wang J, Xiao J, Gatalica Z, Recker RR, Xiao GG. Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jun 10. [Epub ahead of print]

Web sites:

INCA: www.inca.gov.br

miRBase: <http://www.mirbase.org/>

TargetScan: <http://www.targetscan.org/>

MicroCosm: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>

PicTar: <http://pictar.mdc-berlin.de/>

PITA: http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html

miRDB: <http://mirdb.org/miRDB/>

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

8. ANEXOS

Anexo A. 137 miRNA diferencialmente expressos (*Fold Change*) entre o grupo Familiar vs normal.

miRNAs	FOLD	miRNAs	FOLD
has-miR-155	-9874.62	hsa-miR-19b-4373098	-5.22
hsa-let-7b	-6.75	hsa-miR-202-4395474	-46.68
hsa-let-7c	-8.91	hsa-miR-204-4373094	-33.50
hsa-let-7d	-4.67	hsa-miR-205-4373093	-4.43
hsa-let-7f-	-14.63	hsa-miR-212-4373087	-29.53
hsa-let-7g-4395393	-4.43	hsa-miR-214-4395417	-6.85
hsa-miR-100-4373160	-15.10	hsa-miR-221-4373077	-4.86
hsa-miR-125a-3p-4395310	-9.66	hsa-miR-223-4395406	-17.74
hsa-miR-125b-4373148	-15.38	hsa-miR-24-4373072	-2.68
hsa-miR-126-4395339	-9.40	hsa-miR-26a-4395166	-7.13
hsa-miR-130a-4373145	-12.11	hsa-miR-27a-4373287	-6.80
hsa-miR-133a-4395357	-64.98	hsa-miR-27b-4373068	-9.31
hsa-miR-133b-4395358	-711.43	hsa-miR-28-3p-4395557	-4.53
hsa-miR-134-4373299	-66.36	hsa-miR-296-5p-4373066	-18.78
hsa-miR-139-5p-4395400	-31.23	hsa-miR-29a-4395223	-6.09
hsa-miR-140-3p-4395345	-36.17	hsa-miR-29c-4395171	-10.31
hsa-miR-140-5p-4373374	-7.10	hsa-miR-320-4395388	-5.54
hsa-miR-142-5p-4395359	-63.92	hsa-miR-323-3p-4395338	-49.60
hsa-miR-143-4395360	-7.53	hsa-miR-324-3p-4395272	-14.03
hsa-miR-145-4395389	-21.62	hsa-miR-324-5p-4373052	-3.71
hsa-miR-148b-4373129	-12.68	hsa-miR-326-4373050	-1057.15
hsa-miR-152-4395170	-3.92	hsa-miR-328-4373049	-18.52
hsa-miR-181a-4373117	-26.20	hsa-miR-330-3p-4373047	-137.25
hsa-miR-181c-4373115	-82.65	hsa-miR-331-3p-4373046	-3.50
hsa-miR-185-4395382	-16.58	hsa-miR-331-5p-4395344	-117.36
hsa-miR-18b-4395328	-6.49	hsa-miR-337-5p-4395267	-12.69
hsa-miR-193a-3p-4395361	-174.56	hsa-miR-339-5p-4395368	-14.95
hsa-miR-193a-5p-4395392	-8.89	hsa-miR-34a-4395168	-3.27
hsa-miR-193b-4395478	-6.36	hsa-miR-34c-5p-4373036	-18.61
hsa-miR-194-4373106	-15.46	hsa-miR-362-5p-4378092	-6.62
hsa-miR-195-4373105	-5.30	hsa-miR-363-4378090	-8.49
hsa-miR-196b-4395326	-3.06	hsa-miR-365-4373194	-13.64
hsa-miR-197-4373102	-22.77	hsa-miR-370-4395386	-56.18
hsa-miR-198-4395384	-357.98	hsa-miR-372-4373029	-68.34
hsa-miR-199a-5p-4373272	-20.34	hsa-miR-373-4378073	-88.81
hsa-miR-199b-5p-4373100	-70.00	hsa-miR-374b-4381045	-5.13
		hsa-miR-376c-4395233	-16.04

miRNAs	FOLD	miRNAs	FOLD
hsa-miR-379-4373349	-146.44	hsa-miR-518f-4395499	-167.44
hsa-miR-382-4373019	-44.23	hsa-miR-519d-4395514	-152.90
hsa-miR-383-4373018	-842.69	hsa-miR-532-3p-4395466	-7.29
hsa-miR-410-4378093	-80.78	hsa-miR-548a-5p-4395523	-30.14
hsa-miR-411-4381013	-17.22	hsa-miR-548b-3p-4380951	-30.14
hsa-miR-422a-4395408	-12.03	hsa-miR-548c-5p-4395540	-20.40
hsa-miR-423-5p-4395451	-12.76	hsa-miR-548d-3p-4381008	-30.14
hsa-miR-425-4380926	-16.11	hsa-miR-548d-5p-4395348	-177.56
hsa-miR-433-4373205	-42.10	hsa-miR-574-3p-4395460	-8.39
hsa-miR-449a-4373207	-30.43	hsa-miR-589-4395520	-47.30
hsa-miR-450a-4395414	-73.84	hsa-miR-597-4380960	-17.74
hsa-miR-455-3p-4395355	-9.94	hsa-miR-598-4395179	-7.42
hsa-miR-455-5p-4378098	-15.65	hsa-miR-618-4380996	-33.70
hsa-miR-483-5p-4395449	-13.72	hsa-miR-625-4395542	-3.86
hsa-miR-485-3p-4378095	-10.06	hsa-miR-627-4380967	-37.22
hsa-miR-486-5p-4378096	-2102.66	hsa-miR-629-4395547	-3.93
hsa-miR-487b-4378102	-15.09	hsa-miR-636-4395199	-41.04
hsa-miR-491-5p-4381053	-4.53	hsa-miR-652-4395463	-6.64
hsa-miR-492-4373217	-1512.75	hsa-miR-654-3p-4395350	-42.79
hsa-miR-493-4395475	-12.09	hsa-miR-655-4381015	-252.64
hsa-miR-495-4381078	-15.19	hsa-miR-660-4380925	-7.93
hsa-miR-499-3p-4395538	-30.14	hsa-miR-671-3p-4395433	-9.98
hsa-miR-500-4395539	-9.38	hsa-miR-708-4395452	-4.36
hsa-miR-502-3p-4395194	-5.76	hsa-miR-758-4395180	-169.23
hsa-miR-504-4395195	-17.06	hsa-miR-871-4395465	-30.14
hsa-miR-505-4395200	-53.80	hsa-miR-875-3p-4395315	-30.14
hsa-miR-510-4395352	-30.14	hsa-miR-886-5p-4395304	-26.49
hsa-miR-511-4373236	-13.34	hsa-miR-887-4395485	-30.14
hsa-miR-512-3p-4381034	-61.71	hsa-miR-888-4395323	-594.32
hsa-miR-513-5p-4395201	-2126.25	hsa-miR-892a-4395306	-30.14
hsa-miR-517a-4395513	-16.25	hsa-miR-92a-4395169	-2.92
hsa-miR-518a-5p-4395507	-30.14	hsa-miR-98-4373009	-4567.00
hsa-miR-518b-4373246	-14652.34	hsa-miR-99a-4373008	-22.53
		hsa-miR-99b-4373007	-14.30

Anexo B. 44 miRNAs diferencialmente expressos (*Fold Change*) entre o grupo não-familiar vs normal.

miRNAs	FOLD	miRNAs	FOLD
hsa-let-7b	-22.619	hsa-miR-370	-21.410
hsa-let-7c	-27.351	hsa-miR-423-5p	-15.422
hsa-let-7d	-6.815	hsa-miR-425	-3.294
hsa-let-7e	-7.286	hsa-miR-433	-18.168
hsa-let-7f	-6.673	hsa-miR-449a	-15.105
hsa-miR-134	-11.719	hsa-miR-491-5p	-5.604
hsa-miR-143	-5.583	hsa-miR-499-3p	0.175
hsa-miR-197	-2.846	hsa-miR-502-3p	-4.063
hsa-miR-202	-11.339	hsa-miR-510	0.622
hsa-miR-204	-33.911	hsa-miR-512-3p	-6.236
hsa-miR-205	-12.612	hsa-miR-513-5p	-21.551
hsa-miR-27a	-3.244	hsa-miR-532-3p	-4.229
hsa-miR-296-5p	-9.278	hsa-miR-548a-5p	-24.518
hsa-miR-29c	-5.690	hsa-miR-548c-5p	-5.633
hsa-miR-31	-4.893	hsa-miR-589	-10.054
hsa-miR-320	-6.891	hsa-miR-636	-14.274
hsa-miR-324-3p	-10.589	hsa-miR-654-3p	-17.795
hsa-miR-326	-12.842	hsa-miR-758	-13.634
hsa-miR-328	-18.298	hsa-miR-871	-4.108
hsa-miR-331-5p	-23.933	hsa-miR-875-3p	-2.567
hsa-miR-34a	-4.177	hsa-miR-887	-23.464
hsa-miR-363	-7.240	hsa-miR-892a	-24.518

9. ADENDOS

Adendo A.

Oasis, The Online Abstract Submission System

<http://www.abstractsonline.com/submit/SubmitPrinterFriendlyVersi...> [Print this Page for Your Records](#)[Close Window](#)**Control/Tracking Number:** 10-A-4735-AACR**Activity:** Abstract Submission**Current Date/Time:** 2/10/2010 9:55:17 AM**Determination of microRNA expression profile in tumors from young women with breast cancer****Short Title:**

miRNAs in early onset breast cancer

Author Block: Elen P. Bastos¹, Helena P. Brentani², Dirce M. Carraro², Maria I. Achatz², Eloisa H. Olivieri², Maria S. Maciel², Rodrigo Michelli³, Maria Mitzi Brentani¹. ¹Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Hospital A. C. Camargo, São Paulo, Brazil; ³Hospital de Cancer de Barretos, São Paulo, Brazil

Abstract: Background: MicroRNAs (miRNA) are endogenous small non-coding RNAs which regulate the expression of many important protein-coding genes in a sequence-specific approach. MicroRNAs generally play a role as negative regulators of mRNA translation and stability. Each of miRNA binds to many critical targets related to cell proliferation, cell differentiation and cell death. MicroRNAs have been shown to be strongly related to human cancer and could suggest new disease conduction. However the miRNA signature profile has not been explored in tumors from young women with Breast Cancer which have been correlated with poor survival and aggressive features. Methods/Results: Fifty tumor tissues from Brazilian patients diagnosed with ductal infiltrative breast carcinoma before the age of 35, were obtained from AC.Camargo Hospital and Hospital de Cancer de Barretos, SP, Brazil. BRCA1/2 status was analyzed. For an initial study, twenty patients were selected: 10 with familial history of breast and ovarian suggestive of hereditary condition according to NCCN criteria and 10 without familial history. Patients of both groups were of non carriers of BRCA1/2 mutations. Total RNA isolation from each tumor was successfully done with RNeasy Mini Kit (Qiagen). The determination of microRNA expression profile between those 2 groups was performed by TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystem), composed by 384 miRNAs assays. All real time PCR reactions were performed using a 7900 System Real Time PCR cycler (Applied Biosystem) according to manufacturer instructions. Relative quantification of miRNA expression was calculated with the delta Ct method based on average threshold 0.2 (SDS Applied Biosystem software). Data were normalized using endogenous miRNA presented in each array. Statistical comparisons were performed using Student T test with adjusted Bonferroni correction. 81 miRNAs were differentially expressed between the two groups of patients. Among these miRNAs some which were upregulated in tumors of patients with a familial history and downregulated in the other group have been previously described in breast cancer such as: miR-202, miR-221, miR-371-3p, miR-384, miR-561 and miR-660. It was found that miR-129-5p, miR-219-5p, miR-487a and miR-510 were superexpressed in the sporadic cases. MicroRNA predicted targets were downloaded from three websites: PicTar, TargetScanHuman and miRanda. A number of predicted targets included the estrogen receptor (ESR1), p53, BRCA2, PTEN, ERCC6 among others. Conclusion: Our data suggested that tumors from familial or sporadic cases presented particular miRNA expression patterns suggestive of alternative molecular pathways of the disease. This is the first evidence of miRNA expression in tumors of early onset breast cancer tumors patients, suggesting the possibility that miRNA genes may lead to the new biomarkers detection for tumors of BRCA1/2 non carrier's patients.

Author Disclosure Information: E.P. Bastos, FAPESP (2009/02040-4) Full-time/Part-time Employee; H.P. Brentani, FAPESP Full-time/Part-time Employee; D.M. Carraro, FAPESP Full-time/Part-time Employee; M.I. Achatz, None; E.H. Olivieri, None; M.S. Maciel, None; R. Michelli, None; M.M. Brentani, FAPESP (09/10088-7) Full-time/Part-time Employee.

Category and Subclass (Complete): CB13-03 miRNA profiling in cancer

Organ Site/ Clinical Track (Complete):

*Primary Organ Site: Breast cancer

Special Consideration: Not Applicable

Chemical Structure Disclosure (Complete):

Choose Chemical Structure Disclosure: NOT APPLICABLE. No compounds with defined chemical structures were used.

Adendo B.