

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Expressão de miRNAs como fator de predição de resposta a
quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama**

Aluna: Fabiana de Oliveira Buono

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

**RIBEIRÃO PRETO, SP
2020**

FABIANA DE OLIVEIRA BUONO

Expressão de miRNAs como fator de predição de resposta a quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

**RIBEIRÃO PRETO, SP
2020**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Buono, Fabiana de Oliveira

Expressão de miRNAs como fator de predição de resposta a quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama, 2020.

57 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

1. Câncer de mama
2. microRNAs
3. Terapia neoadjuvante

Fabiana de Oliveira Bueno

Expressão de miRNAs como fator de predição de resposta a quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura:

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a me dedicar a ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que tenho tido em minha vida.

Aos meus pais, Fábio e Déia, que sempre me apoiaram em todas as decisões e escolhas que fiz até hoje. Por me darem todo o suporte necessário para que realizasse meus sonhos, por me ensinarem a vencer na vida com honestidade e dignidade e por me amarem incondicionalmente.

Ao meu irmão Pedro Henrique pelo apoio e paciência.

Ao professor Daniel Guimarães Tiezzi, meu orientador e exemplo profissional, a minha gratidão pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela confiança. Meu respeito e admiração.

À Suelen Bezerra e funcionários do departamento de ginecologia e obstetrícia, pela atenção com que sempre nos tratam e os auxílios que nos prestam.

À Cristiane Padovan e professora Juliana Meola que me aceitaram no laboratório de coração aberto e sempre dispostas a auxiliar.

Aos meus amigos de laboratório e departamento, que fizeram os meus dias mais alegres e leves.

À Maria Fernanda pela amizade e suporte nos momentos de dificuldades.

A Renata Scchieri, por me auxiliar com seus ensinamentos e amizade.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-FMRP-USP e seu Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela oportunidade em realizar minha pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, do CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e da FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (processo: 201113020-4).

"Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas" (Louis Pasteur)

RESUMO

BUONO, F.O. **Expressão de miRNAs como fator de predição de resposta a quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama**, 2020. 57f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo é identificar miRNAs e seus RNAm-alvos associados à resposta à quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama.

METODOLOGIA: Foram utilizadas amostras de pacientes com suspeita de diagnóstico de carcinoma de mama localmente avançado no HCFMRP-USP. Analisamos 384 miRNAs por PCRq usando o kit TaqMan® Low Density Arrays (TLDA). Fizemos uma análise comparativa da expressão dos microRNAs entre os pacientes que responderam ou não à terapia primária. Para análise de correlação da expressão de todos os genes do transcriptoma humana com os 24 miRNAs diferencialmente expressos (DE), utilizamos o banco de dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA). Usamos os dados normalizados de expressão gênica global (RNAseq) e de miRNAs (miRNAseq).

RESULTADOS: Identificamos em nosso estudo que a resposta patológica à quimioterapia primária está associada a diferentes padrões de expressão de miRNAs no tumor. O perfil de expressão de 24 miRNAs é um potencial modelo preditivo de resposta à quimioterapia em tumores avançados da mama. A análise *in silico* de um grande número de amostras do câncer de mama identificou o miR-519a como um potencial alvo de investigação clínica.

CONCLUSÃO: A análise de clusterização baseada na expressão dos 24 miRNAs permite classificar os tumores em dois grupos. Esta classificação está associada com a resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante. O miRNA miR-519a e seus alvos são potenciais moduladores das vias carcinogênicas e podem ser uma fonte de investigação adicional como possível biomarcador.

Palavras-chave: Câncer de mama, microRNAs, Terapia Neoadjuvante

ABSTRACT

BUONO, F.O. **miRNAs expression as predictor factor of response to primary chemotherapy in breast cancer patients**, 2020. 57f. Dissertation (Master degree) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Background The aim of this study is to identify miRNAs and their targets mRNA associated with response to neoadjuvant chemotherapy in patients with invasive ductal carcinomas.

Material and Methods: Samples of patients were used with suspected diagnosis of locally advanced breast carcinoma who underwent core needle biopsy at Hospital das Clínicas, FMRP-USP. Total RNA was quantified for further analysis of 384 miRNAs by PCRq using TaqMan® Low Density Arrays (TLDA). We performed a comparative analysis of microRNAs expression among patients who responded or not to primary therapy. To analyze the correlation of the expression of whole transcriptome expression and the 24 miRNAs DE, we used the database The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Results: We identified in our study that the pathological response to primary chemotherapy is associated with different patterns of expression of miRNAs in the tumor. The expression profile of 24 miRNAs is a potential predictive model of response to chemotherapy in advanced breast tumors. *In silico* analysis of a large number of breast cancer samples has identified miR-519a as a potential target for clinical investigation.

Conclusion: Cluster analysis based on the expression of 24 miRNAs allows the tumors to be classified into two groups. This classification is associated with the pathological response to neoadjuvant chemotherapy. miRNA miR-519a and its targets are potential modulators of carcinogenic pathways and can be a source of further investigation as a possible biomarker.

Key words: Breast cancer; microRNAs; Neoadjuvant Therapy

LISTA DE ABREVIÇÕES

CMLA	Câncer de mama localmente avançado
QTNA	Quimioterapia neoadjuvante
pCR	Resposta patológica completa
PAM50	<i>Prediction Analysis of Microarray 50</i>
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
<i>ESR1</i>	Receptor de estrogênio 1
ER	Receptor de estrogênio
PR	Receptor de Progesterona
<i>ERBB2</i>	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
FISH	Hibridização in situ fluorescente
IHQ	Imuno-histoquímica
CK	Citoqueratina
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
miRNAs	MicroRNA
UTR	Região complementar não traduzida
RNA _m	RNA mensageiro
RNA	Ácido Ribonucleico
pri-miRNA	miRNA-primário
Pasha	Proteína nuclear DGCR8
Drosha	Endoribonuclease Específica de RNA de Fita Dupla
Dicer	RNAase III
pré-miRNA	miRNA- precursor
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
OCT	Temperatura Ótima de Corte
H&E	Hematoxilina e Eosina
CISH	Hibridização cromogênica in situ
DEPC	Dimetil pirocarbonato
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
cDNA	DNA complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
RNase	Ribonuclease
TLDA	<i>TaqMan® Low Density Arrays</i>
PCR _q	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RD	Doença residual
DE	Diferencialmente expressos
FDR	Taxa de descoberta falsa
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
GDC	<i>Genomic Data Commons</i>
AJCC	<i>American Joint on Cancer</i>

RPPA	<i>Reverse Phase Protein Array</i>
ERALPHA	Receptor de Estrgeno Alpha
ECM	Matriz Extracelular
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
intClust	<i>Integrative clusters</i>
<i>PTEN</i>	Homólogo de Fosfatase e Tensina
<i>AKT3</i>	Proteína kinase B
<i>CDKN1A/p21</i>	Inibidor 1A de Kinase Dependente de Ciclina
<i>PARP1</i>	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
<i>PPP2CA</i>	Subunidade catalítica da proteína fosfatase 2 alfa
<i>ZCCHC10</i>	<i>Zinc finger CCHC-type containing 10</i>
<i>TP53</i>	Tumor protein p53
MAF	<i>Mutation Annotation Format</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
NK	Células Natural Killer
EC-T	Epirrubicina e Ciclofosfamida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Biosíntese do miRNA. Fonte: (MACK, 2007)	22
Figura 2 Heatmap da análise da expressão diferencial dos miRNAs e dos parâmetros clínico – patológicos dos pacientes com carcinoma de mama do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.	37
Figura 3 Barplot onde os dados são apresentados na ordem do maior número de genes impactados para o menor, com a porcentagem de alvos totais afetados pelo miRNA em vermelho e a porcentagem do total de genes DE afetados pelo miRNA em azul. (ferramenta miRMapper).....	39
Figura 4 Boxplot do teste não-paramétrico e pareado de Wilcoxon entre as amostras de tecido normal e tumoral –BRCA dos pacientes do TCGA (** = $p < 0,05$)	40
Figura 5 Expressão do miR-519a (RT-PCR em tempo real) em pacientes com resposta patológica completa (cPR) e doença residual (RD) após a quimioterapia primária ($p= 0.003$)......	41
Figura 6 Análise comparativa da expressão da proteína ERALPHA (RPPA) e a porcentagem de células positivas para RE na IHQ das amostras do TCGA.....	42
Figura 7 Expressão do miR-519a e da proteína ERalpha (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.35, p < 0.0001$).....	43
Figura 8 Expressão do miR-519a em relações amostras que apresentam ou não mutações somáticas no gene TP53 em carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. ($p= 0.00018$)	45
Figura 9 Expressão do miR-519a em relação as mutações e wild type do gene TP53 em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA.	45
Figura 10 Expressão do miR-519a e da proteína BCL2 (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.18, p = 1.432e-07$).....	46
Figura 11 Expressão do miR-519a e da proteína CASPASE 3 (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = 0.082, p = 0.0162$).	46
Figura 12 Expressão do miR-519a e da proteína FASN (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.17, p = 7.888e-07$).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Característica Clínica dos pacientes com carcinoma de mama localmente avançados do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.....	34
Tabela 2 Vias de sinalização dos miRNAs diferencialmente expressos utilizando a base de dados Diana tools e miRWalk.....	36
Tabela 3 Associação entre a expressão do miR-519 e parâmetros clínicos e moleculares do banco de dados do TCGA (teste de Kruskal-Wallis).....	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Predição miRNA-alvos de diversos bancos de dados, através da ferramenta MultiMir no R	59
Anexo 3 Expressão do miR-519a em relação aos graus histológicos do câncer de mama dos pacientes do TCGA	59
Anexo 2 Expressão do miR-519a em relação aos subtipos tumorais do câncer de mama dos pacientes do TCGA	59
Anexo 4 Expressão do miR-519a em relação aos subtipos do iClust de câncer de mama dos pacientes do TCGA	60
Anexo 5 Expressão do miR-519a em relação aos estágios tumorais do câncer de mama dos pacientes do TCGA	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Câncer de Mama	17
1.2. microRNAs	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. METODOLOGIA	27
4.1. Características das pacientes	34
4.2. Técnica para obtenção das amostras	27
4.3. Caracterização das amostras por Hematoxilina e Eosina (H&E) e Imuno-histoquímica	27
4.4. Extração de RNA tecidual	28
4.4.1. Quantificação e Análise da integridade das amostras de RNA total	29
4.5. Taqman Low Density Array de MicroRNAs	29
4.5.1. Síntese de DNA complementar (cDNA) com Megaplex™ RT Primers	29
4.5.2. Pré-amplificação do cDNA com Megaplex™ PreAmp Primers	30
4.5.3. Quantificação de microRNAs por PCRq utilizando TaqMan® Low Density Arrays (TLDA)	30
4.6. Protocolo de tratamento quimioterápico	31
4.7. Resposta ao tratamento	31
4.8. Análise de bioinformática	31
5. RESULTADOS	34
5.1. Expressão diferencial de miRNAs no câncer de mama	35
5.2. Classificação molecular baseada na expressão de miRNAs	36
5.3. Correlação entre miRNAs-RNAm alvos	37
5.4. Análise comparada entre amostras tumorais e mama normal (TCGA)	38
5.5. Análise do miR-519a associado às características clínicas	40
6. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama

Devido ao aumento na exposição aos fatores de riscos e na expectativa de vida, o câncer é hoje considerado a segunda causa de morte no mundo, (BANIN HIRATA et al., 2014). O câncer de mama é a neoplasia maligna que mais acomete as mulheres. Somente no ano de 2018, ocorreram mais de 2 milhões de novos casos, o que corresponde a 11,6% do total de casos de câncer no mundo (“Global Cancer Observatory”, [s.d.]). No Brasil, o câncer de mama corresponde a cerca de 29% de novos casos e, em 2018, 85.620 casos foram registrados (“Global Cancer Observatory”, [s.d.]; INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, [s.d.]).

O câncer de mama invasivo pode levar a metástase por disseminação linfática ou sanguínea. A disseminação metastática é a principal causa de morte pelo câncer de mama. Os órgãos que mais frequentemente afetados são ossos, pulmões, fígado e cérebro (AKRAM et al., 2017). A doença sistêmica está diretamente associada com o estágio do tumor ao diagnóstico. Apesar dos avanços na detecção precoce e no tratamento do câncer de mama, mesmo em países desenvolvidos como os EUA e a Noruega, a prevalência do câncer de mama em estágio avançado e metastático é de 12% e na Alemanha em torno de 10,5% (TIEZZI et al., 2019; VON MINCKWITZ et al., 2019; WARD et al., 2019) . Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a prevalência do câncer de mama localmente avançado e metastático chega a 40% (CECILIO et al., 2015; TIEZZI et al., 2019).

O tratamento primário do câncer de mama localmente avançado (CMLA) e metastático é a quimioterapia. Para as doenças localmente avançadas, a quimioterapia primária é denominada de quimioterapia neoadjuvante (QTNA). Nesta situação, a resposta ao tratamento está associada à melhora de sobrevida específica da doença. Estudos recentes mostram que, os casos de resposta patológica completa (pCR) apresentam melhor evolução clínica. A pCR é caracterizada pela ausência de carcinoma invasivo residual na mama e em linfonodos axilares. A QTNA pode ser considerada um modelo *in vivo* de avaliação da sensibilidade da neoplasia ao tratamento quimioterápico. A associação entre pCR e melhora da sobrevida parece estar restrito à alguns subtipos moleculares do

câncer de mama (DÍAZ-CASAS et al., 2019; FIROUZABADI et al., 2019; HARBECK; GNANT, 2017).

Na doença metastática, o tratamento citotóxico primário tem uma implicação paliativa. O objetivo é reduzir o volume de doença sistêmica reduzindo sintomas decorrentes da disseminação metastática e ampliar a sobrevida do paciente. Neste cenário, a quimioterapia está indicada em casos de doença visceral (acometimento pulmonar ou hepático, por exemplo) e em alguns subtipos moleculares do câncer de mama (HARBECK; GNANT, 2017; KLEIN et al., 2019; SELLI; SIMS, 2019).

Baseados na expressão genética global é possível identificar pelo menos 5 subtipos moleculares do câncer de mama. Uma classificação denominada de PAM50 classifica os carcinomas de mama nos subtipos Luminal A e B. Basal, HER2 e o normal-like. Os subtipo Luminais apresentam alta expressão do gene *ESR1*, que codifica o receptor de estrogênio (ER), bem como outros genes relacionados à via de sinalização do estradiol (PEROU et al., 2000; RAKHA; GREEN, 2017). O subtipo luminal pode ser subdividido entre A e B. Luminal A, possui ER e PR positivos e HER2 negativo, baixa proliferação celular ($ki67 < 14\%$), corresponde a cerca de 30-40% dos casos. Já o luminal B, apresenta ER e PR positivos e HER2 positivo/negativo, alta proliferação celular ($ki67 > 14\%$) e corresponde a 20-30% (DÍAZ-CASAS et al., 2019; HARBECK; GNANT, 2017; RAKHA; GREEN, 2017; SUN et al., 2019). O subtipo luminal A normalmente apresenta poucas mutações gênicas enquanto o subtipo luminal B encontra-se hipermetilado. Os dois subtipos respondem ao tratamento hormonal, porém o luminal A possui melhor prognóstico que o luminal B (PRAT et al., 2015).

Outra classe apresenta os tumores com alta expressão do gene *ERBB2*. O gene *ERBB2* codifica a proteína HER2, um receptor de membrana da família dos EGFRs (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*). A superexpressão do gene *ERBB2* está diretamente associada com um aumento do número de cópias do gene (amplificação). (BANIN HIRATA et al., 2014; PEROU et al., 2000). Seu status é confirmado por hibridização in situ fluorescente (FISH) quando há positividade por imuno-histoquímica (IHQ) (BANIN HIRATA et al., 2014; RAKHA; GREEN, 2017). Apresenta receptores hormonais negativos (ER-, PR -) e corresponde de 12-20% dos casos (DÍAZ-CASAS et al., 2019; RAKHA; GREEN, 2017; SUN et al., 2019). É considerado um marcador de prognóstico ruim, pois a superexpressão leva a

resistência a tratamento anti-hormonal e terapias citotóxicas, agressividade tumoral, baixa sobrevida e normalmente apresentam alto grau histológico (BANIN HIRATA et al., 2014; HENG et al., 2017; RAKHA; GREEN, 2017).

Os tumores do tipo Basal não expressam receptores hormonais (ER, PR) e HER2, porém possuem expressão de genes de células basais, tais como, citoqueratina (CK) 5/6 + e também do gene EGFR + e correspondem a 15-20% dos casos (HARBECK; GNANT, 2017; PEROU et al., 2000; RAKHA; GREEN, 2017; SUN et al., 2019). Essa classe de tumores apresenta alta atividade proliferativa, alto grau histológico e necrose tumoral (HENG et al., 2017; RAKHA; GREEN, 2017), são pouco responsivos ao tratamento citotóxico e possuem um prognóstico ruim (PRAT et al., 2015).

Por fim, os tumores normal-like se caracterizam por não apresentarem expressão de receptores hormonais e do HER2 e possuir o perfil de expressão gênica de células adiposas e do epitélio basal, células características do tecido normal da mama (PEROU et al., 2000; RAKHA; GREEN, 2017). Sugere-se que essa classe tumoral tenha sido influenciada pela contaminação de tecido normal da mama (PRAT et al., 2015). Com esse estudo, Perou e colaboradores demonstraram que a nível transcriptômico o câncer de mama é uma doença heterogênea e não uma doença única (PEROU et al., 2000; RAKHA; GREEN, 2017).

Outro estudo utilizando a base de dados METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*), propôs uma nova classificação dividindo o câncer de mama em clusters. Os 10 clusters integrativos (IntClust1-10) foram subdivididos de acordo com o número de cópias aberrantes (CNA), características histopatológicas e clínicas. Subgrupo IntClust 2 é composto por tumores ER-positivo e luminais e ampliações para os genes CCND1 e EMSY. IntClust3 apresenta baixa instabilidade genômica, composto majoritariamente por tumores Luminal A, por carcinomas invasivos tubulares e lobulares e apresenta bom prognóstico. O subgrupo IntClust 4 também apresenta bom prognóstico, tumores ER positivos e negativos, poucos casos de CNA e alta infiltração linfocítica. Os subtipos IntClust 1, 6 e 9 apresentam prognóstico intermediário, tumores classificados como Luminal B, porém possuem instabilidade em diferentes locos cromossômicos (17q23 / 20q, 8p12, 8q, respectivamente). Os subtipos IntClust 7 e 8, apresentam predominantemente tumores Luminal A, onde o IC7 apresenta altas

taxas amplificação no locus cromossomal 8q, enquanto o IC8 apresenta ganho no locus 1q e perda no locus 16q. IntClust 10, apresenta tumores Basais e alta instabilidade genômica. IntClust 5, apresenta tumores HER2 positivos (com ER negativo) e luminais com ER positivos, e apresentam um prognóstico ruim (CURTIS et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2018).

Mesmo com vários avanços em terapias contra o câncer, ocorre resistência medicamentosa levando a falha no tratamento e recorrência do câncer. Porém, ainda não é completamente compreendido quais os mecanismos moleculares subjacentes a resistência (BOLLIG-FISCHER et al., 2014; LIU; GUO; ZHOU, 2015). Mas, infere-se que resistência possa ser devido a mutações somáticas, modificações epigenéticas, desregulação da apoptose, vias de sinalização adaptadas, reprogramação metabólica e modificação no transporte de droga (HU et al., 2018).

Um estudo prospectivo e randomizado em pacientes com câncer de mama utilizando terapia primária, demonstrou uma resposta clínica satisfatória, com taxas variando entre 50 a 80%. Outro estudo com o mesmo tipo de câncer, mas com superexpressão de HER2+, demonstrou que pacientes que foram submetidas a terapia alvo para HER2 juntamente com a quimioterapia antes da cirurgia, obtiveram altas taxas de resposta clínica, levando a melhora da sobrevida do paciente (SUBBIAH et al., 2017). Os resultados dessa terapia podem ser obtidos em um período curto de tempo, mas, também é possível que novas medidas possam ser tomadas em relação a esse tipo de tumor. Nesse sentido, novos testes de biomarcadores podem ser feitos, para que possam ser averiguados como marcadores preditivos da doença e de prognóstico (SUBBIAH et al., 2017; ZHU et al., 2018).

Embora já tenha sido traçado o perfil molecular do câncer de mama com base em sua expressão gênica, proteômica, alterações no número de cópias do DNA, mutações cromossômicas, metilações e microRNAs, e o conhecimento sobre o câncer de mama esteja em expansão, a aplicação clínica permanece limitada. São necessários biomarcadores mais sensíveis para auxiliar na diferenciação de tumores malignos e benignos, in situ e invasivos, e subtipos do câncer de mama (RAKHA; GREEN, 2017). Nesse sentido, miRNAs vêm sendo estudados e propostos como marcadores biológicos nos últimos anos por apresentarem

estabilidade, pois não se degradam facilmente. Sua obtenção requer processos minimamente invasivos, podem ser dosados rapidamente e vem sendo associados ao câncer em inúmeros estudos nos últimos anos (FERRACIN et al., 2015; LÜ et al., 2017; SWELLAM et al., 2018b; ZHU et al., 2018).

1.2. microRNAs

microRNAs são pertencentes a uma classe de pequenos e não-codificantes RNAs, apresentam em torno de 20 a 25 nucleotídeos. Se ligam especificamente a região complementar não traduzida (UTR) 3' do RNAm, podendo modular a expressão, levando-o ao silenciamento ou degradação (HIRONAKA-MITSUHASHI et al., 2017; HU et al., 2018; LI et al., 2017; MISHRA et al., 2015; YAMADA et al., 2018). Um único miRNA pode regular inúmeros RNAsm (genes) e um único RNAm pode ser regulado por diversos miRNAs, podendo assim regular diversas vias e processos fisiológicos e patológicos (HU et al., 2018; IWASAKI et al., 2015). Tem sido demonstrado que alguns miRNAs podem atuar como ativadores da expressão gênica, direcionando sequências reguladoras de genes, além de regularem processos celulares importantes fisiologicamente, tais como, proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. Uma pequena desregulação em uma região do microRNA afeta a expressão normal de milhares de RNAm, o que pode levar a transformação celular (ASIAF et al., 2018; BANIN HIRATA et al., 2014).

A biossíntese do miRNA (Figura 1) inicia-se no núcleo da célula, onde o RNA polimerase II se liga a regiões promotoras específicas da sequência do DNA (podendo ser unidades transcrpcionais ou então dentro dos íntrons de genes codificadores de proteínas), formando dessa forma o miRNA-primário também chamado de pri-miRNA, apresentando um loop, ou uma estrutura *hair pin*. O pri-miRNA é metilado na região 5' e poliadenilado na região 3'. Se o loop estiver na região 3' UTR, o transcrito serve como pri-miRNA, que apresenta em torno de 1 kb de nucleotídeos de comprimento, e sua região de dupla fita é reconhecida pela proteína nuclear DGCR8 ou "Pasha". A Pasha se associa a proteína Drosha e transforma o pri-miRNA em pré-miRNA ou miRNA precursor (apresenta em torno de 70 nucleotídeos), pois corta alguns nucleotídeos da estrutura *hair pin*. O pré-miRNA será exportado para o citoplasma da célula com o auxílio da proteína de transporte ativo, exportina 5. Já no citoplasma da célula a proteína Dicer (RNAase

III) cliva o loop do pré-miRNA, tornando-se miRNA maduro. A proteína Ago2 se liga ao miRNA formando o RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que se ligará ao RNAm. Há duas formas do complexo RISC e do miRNA se ligarem ao RNAm, a primeira forma dá-se por uma ligação completa por complementariedade de bases, e o RNAm é degradado. Já a segunda forma ocorre quando a ligação por complementariedade de base é parcial, a tradução é inibida mas o RNAm não é degradado. Dessa forma, tem-se como resultado final, a diminuição da proteína codificada pelo RNAm alvo (ASIAF et al., 2018; VIMALRAJ et al., 2013).

Apesar de terem sido descobertos em 1993, por Lee e colaboradores (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), a primeira evidência do envolvimento dos miRNAs com câncer humano ocorreu a partir de um estudo de caracterização molecular da deleção no cromossomo 13q14 em uma amostra de leucemia linfocítica crônica, e foi detectado que nesse *locus* haviam dois cluster de miRNA. A partir de então, outras evidências de desregulação de miRNAs em câncer foram identificadas (ASIAF et al., 2018).

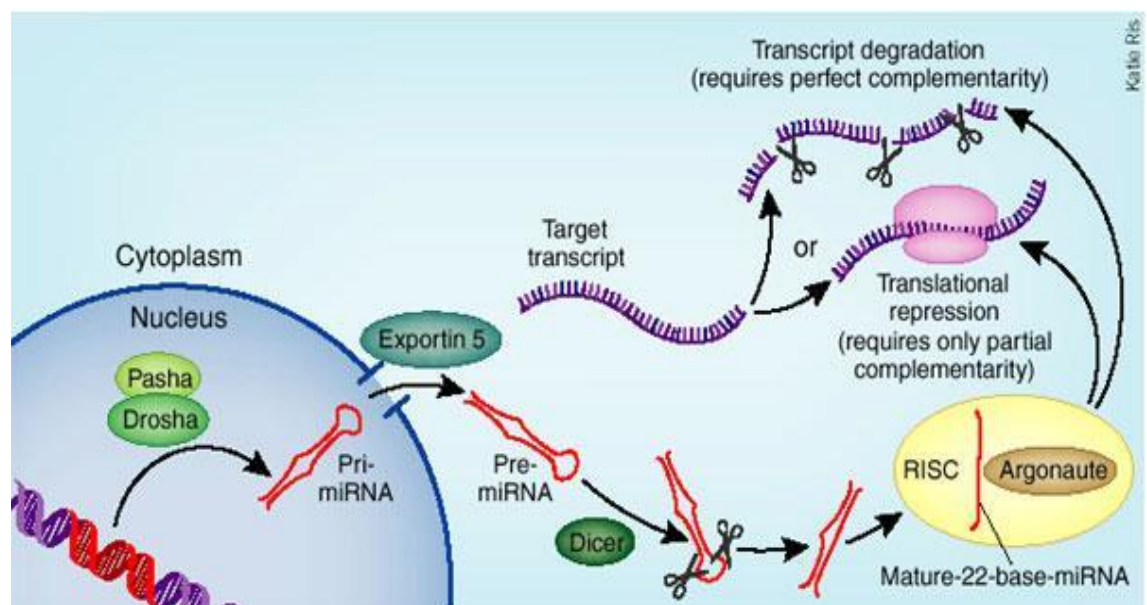


Figura 1 Biossíntese do miRNA. Fonte: (MACK, 2007)

Infere-se a ligação dos miRNAs ao câncer pois eles normalmente se localizam em regiões frágeis dos cromossomos, que geralmente estão associadas a amplificações, deleções, translocações que podem estar envolvidos ao desenvolvimento oncogênico (ASIAF et al., 2018), havendo assim, uma relação

direta entre a desregulação dos miRNAs e a progressão tumoral (SWELLAM et al., 2018b; ZHU et al., 2018).

Os miRNAs regulam inúmeras vias do câncer, promovendo proliferação, invasão e metástase (HU et al., 2018; IWASAKI et al., 2015; LI et al., 2017; SWELLAM et al., 2018b). Quando hiper-expressos podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, ou então, quando hipoexpressos, atuam como supressores tumorais, podendo ativar ou inibir oncogenes (BANIN HIRATA et al., 2014; YAMADA et al., 2018). Em câncer de mama os miRNAs estão diferencialmente expressos e sua funcionalidade pode variar entre supressores tumorais, oncogenes, moduladores da iniciação tumoral, proliferação, migração, metástase e quimiorresistência (ASIAF et al., 2018; HU et al., 2018; LI et al., 2017; SWELLAM et al., 2018a).

Um estudo com o perfil de expressões em pacientes com câncer de mama, demonstrou que alguns miRNAs foram encontrados em exossomos e relacionados à resistência medicamentosa, devido a capacidade de compartilhar informações genéticas célula-a-célula. Infere-se que o papel dos miRNAs na resistência às drogas seja alterar o transporte dessas drogas, e levar ao efluxo celular da mesma, modificando a apoptose e autofagia, propiciando assim, um aumento na sobrevivência celular, ativando fatores de crescimento que desajustam as vias de sinalização, promovendo a mudança do fenótipo, a transição epitélio-mesenquimal e propiciando a metástase ao aumentar a população de células tumorais circulantes (HU et al., 2018). Nesse sentido é necessária uma análise molecular abrangente para identificar as causas do comportamento agressivo do câncer e possíveis biomarcadores moleculares (DE MATTOS-ARRUDA et al., 2019).

Marcadores moleculares são usualmente utilizados para indicar a presença ou ausência de doenças, classificá-las, e indicar a resposta de um tratamento. Grande parte dos marcadores são proteínas e padrões de expressão gênica, a mutação no DNA no tecido tumoral pode também ser usada como marcador tumoral (BANIN HIRATA et al., 2014). São utilizados para rastreamento e monitoramento de metástase, antígenos tumorais, que são considerados biomarcadores não invasivos. Porém, para o diagnóstico de câncer de mama tais marcadores, não apresentam sensibilidade suficiente (SWELLAM et al., 2018a; ZHU et al., 2018).

Dessa forma, o miRNAs apresentam grande potencial para pesquisa em câncer de mama, pois podem ser utilizados como biomarcadores, preditores de prognóstico e futuros alvos- terapêutico, mais sensíveis e específicos (CHEN et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A resposta clínico patológica completa (pCR) dos pacientes submetidos a quimioterapia primária é um fator determinante de prognóstico. Pacientes com boa resposta terapêutica apresentam uma melhor sobrevida. No entanto, não há até o momento, um fator de predição de resposta. A identificação de fatores preditivos é crucial para otimizar o tratamento, reduzir custos e efeitos indesejáveis, e tem o potencial de identificar alvos terapêuticos. Portanto, é possível prever que exista um perfil de expressão de microRNAs capaz de identificar pacientes com uma boa e má resposta ao tratamento? Se sim, quais os microRNA, genes e vias de sinalização estão envolvidas?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Identificar miRNAs associados à resposta a quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar os mRNA que possuem expressão modulada pelos miRNAs que estão associados a resposta à quimioterapia primária em pacientes com câncer de mama;
- Identificar potenciais alvos terapêuticos para otimização do tratamento citotóxico no câncer de mama.

4. METODOLOGIA

Foram coletadas, prospectivamente no período de Agosto de 2010 a Abril de 2012, amostras de 74 pacientes com suspeita de diagnóstico de carcinoma de mama localmente avançado que foram submetidas à biópsia da mama por agulha grossa, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; Os critérios de inclusão proposto para este projeto são pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama, estágio IIb - IV (doença metastática somente em exames de imagem) e que foram submetidas à quimioterapia primária. Após aplicar os critérios de inclusão baseado na análise das amostras, um total de 33 pacientes foram incluídas no estudo.

As amostras utilizadas foram provenientes do banco de tumor de mama do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, aprovado pela comissão de ética deste hospital sob nº 2467/09. Todas as pacientes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa antes da inclusão. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado antes da coleta e/ou visita (retorno de rotina) da paciente ao ambulatório de Mastologia.

4.1. Técnica para obtenção das amostras

As amostras de tecido tumoral foram coletadas por biópsia percutânea guiada por ultrassom. Imediatamente após o fragmento ser retirado, as amostras foram incluídas imediatamente em Tissue Tek® (OCT) e congeladas em nitrogênio líquido. O material foi utilizado para a extração de RNA para o presente estudo.

4.2. Caracterização das amostras por Hematoxilina e Eosina (H&E) e Imuno-histoquímica

Antes da extração de RNA tecidual das amostras que se encontravam em Tissue tek® (OCT), foi realizado um corte de 5 µm de espessura em criostato para a realização da coloração de H&E para verificação de tecido tumoral nas amostras.

Desta forma foram excluídas amostras de cinco pacientes por não apresentarem células tumorais no fragmento analisado.

Para interpretação dos receptores hormonais seguiu-se as Recomendações do Colégio Americano de Patologistas. Todos os ensaios foram realizados na rotina do Serviço de Patologia do HCFMRPUSP. Foram considerados positivos para receptores hormonais os tumores com marcação nuclear em mais de 1% das células neoplásicas (ALLRED, 2004; HAMMOND et al., 2010; ROYCHOWDHURY, 2012). Para a expressão da proteína HER2, foi considerado como HER2-positivo os tumores categorizados como 3+ na imuno-histoquímica (marcação uniforme e intensa da membrana de mais de 30% das células tumorais) e os 2+ com amplificação do gene ERBB2 comprovada pela hibridização cromogênica in situ (CISH) (FITZGIBBONS et al., 2014)

4.4. Extração de RNA tecidual

As amostras foram adicionadas 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

A amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a - 80°C. Após este passo foi seguido o protocolo para purificação utilizando Kit mirVana para extração do RNA, onde os pequenos e grandes RNAs foram purificados em uma fração, sem separação para enriquecimento de pequenos RNAs.

4.4.1. Quantificação e Análise da integridade das amostras de RNA total

Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Thermo Scientific NanoDrop 2000). Além da concentração de ácidos nucleicos presente na amostra, obtemos um valor da razão referente à pureza das amostras (razão 260/280). A faixa obtida para nossas amostras foi de 1,61 a 1,99. Ao final desta etapa, foi analisada a integridade de cada amostra (*Agilent 2100 Bioanalyser* - Agilent Technologies). Para verificação desta integridade foi realizado o eletroferograma que mostra o padrão de detecção das subunidades ribossomais 18S e 28S e os respectivos valores de RNA Integrity Number (RIN < 7) de cada amostra (BECKER et al., 2010).

4.5. Taqman Low Density Array de MicroRNAs

4.5.1. Síntese de DNA complementar (cDNA) com Megaplex™ RT Primers

As amostras de RNA total foram submetidas à transcrição reversa utilizando o kit comercial TaqMan microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) juntamente com um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores específicos para microRNAs humanos. Para cada amostra foi realizada uma reação de transcrição reversa: com o *Megaplex™ RT Primers, Human Pool A* (Applied Biosystems). Em uma reação de 7,5 µL, foram utilizados 0,80 µL de Megaplex™ RT Primers (10x), 0,20 µL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) contendo desoxitimidina trifosfatada (dTTP) (100mM), 1,5 µL da enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 0,80 µL de RT Buffer (10x), 0,9 µL de MgCl₂ (25mM), 0,10 µL de inibidor de RNase (20U/µL), 0,2 µL de água tratada com DEPC e 30 ng de RNA total em um volume de 3 µL. As amostras foram levadas para o termociclador e submetidas a 40 ciclos à 16°C por 2 min e 42°C por 1 min, seguidos por 1 segundos à 50°C e 5 min à 85°C e resfriadas à 4°C, posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer -20°C por até 7 dias.

4.5.2. Pré-amplificação do cDNA com Megaplex™ PreAmp Primers

Nesta etapa, objetiva-se aumentar a quantidade de cDNA desejado antes da TaqMan® Low Density Arrays (TLDA). Para cada amostra foi realizada uma reação de pré-amplificação com o *Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A (Applied Biosystems)*.

Cada reação de pré-amplificação tem um volume final de 25 µl e contém: 2,5 µL do produto RT (cDNA) e 22,5 µl de Mix Reação PreAmp (Applied Biosystems). Esse Mix contém 12,5 µL de TaqMan® PreAmp Master Mix (2x), 2,5 µL de Megaplex™ PreAmp Primers (10x) e 7,5 µL de água tratada com DEPC. No termociclador, as reações foram submetidas a 95°C por 10 min, 55°C por 2 min, 72°C por 2 min, seguido por 12 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 min, posteriormente aquecido a 99,9°C por 10 min e resfriado a 4°C. Antes de ser submetidos à quantificação da expressão de microRNAs, os produtos da reação de pré-amplificação (volume final de 25 µL) foram diluídos em 75 µL de 0,1X TE pH 8,0, conforme instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas a -20°C por até 7 dias.

4.5.3. Quantificação de microRNAs por PCRq utilizando TaqMan® Low Density Arrays (TLDA)

Para a quantificação da expressão de microRNAs foi utilizado o kit comercial *TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards Set v3.0 (Applied Biosystems)*, juntamente com o *TaqMan® Universal PCR Master Mix, NoAmpErase® 2X*. Nesse cenário o Kit comercial *TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards Set v3.0* é composto por um conjunto de ensaio que possibilita a investigação da expressão de 384 microRNAs maduros, além de 3 genes de referência para normalização dos dados e um controle negativo em cada ensaio. Este ensaio corresponde os microRNAs melhor caracterizados.

Para cada amostra, foi realizada uma reação para o ensaio A. Cada reação foi realizada em um volume final de 900µL, contendo 450 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 9 µL do produto pré-amplificado diluído e água tratada com DEPC. Os procedimentos de aplicação da amostra e selagem dos arrays foram realizados segundo instruções do fabricante. O array foi levado para o equipamento

QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems), onde as amostras foram submetidas a 50°C por 2 min, 94,5°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 97°C por 30 seg e 59,7°C por 1 min. Os valores brutos de Ct foram calculados pelo programa QuantStudio™ 12K Flex Software (Applied Biosystems) e os dados foram analisados com o pacote de software Real Time StatMiner® 5.0 (ABI).

Os miRNAs de controle endógeno que já vieram no kit *TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards Set v3.0* (U6 snRNA-001973, RNU44-001094, RNU48-001006) foram usados como housekeeping para estimar o ddCt e a matriz de expressão foi submetida à normalização por quantil. A biblioteca *HTqPCR* (DVINGE, 2010) para R (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2019) foi usada para processamento e normalização de dados.

4.6. Protocolo de tratamento quimioterápico

Todas as pacientes foram submetidas ao esquema de tratamento proposto pelo protocolo do Setor de Mastologia e Oncologia Ginecológica do HCFMRP-USP.

Pacientes em estágios I, II e III (n=33) fizeram o esquema de quimioterapia primária proposto com EC-T que consiste de 4 ciclos de epirrubina 75mg/m² e ciclofosfamida 600mg/m² em infusão endovenosa no D1 a cada 21 dias seguidos de 4 ciclos de Docetaxel (mg/m²). Os casos HER2+ recebem trastuzumab (EC-TH).

4.7. Resposta ao tratamento

As pacientes foram avaliadas conforme a resposta clínica e patológica locorregional. Consideramos a resposta clínica completa a ausência de tumor palpável na mama e axila após o término da quimioterapia primária. A resposta patológica completa foi definida pela ausência de neoplasia invasiva residual no sítio primário e axila.

4.8. Análise de bioinformática

A análise de expressão comparativa foi realizada entre os pacientes com resposta patológica completa (pRC) e as pacientes com doença residual (RD) após

a terapia primária. Utilizando a biblioteca *limma* (RITCHIE et al., 2015) para R (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2019) e o modelo de expressão diferencial foi ajustado pela expressão de ER e HER. Consideramos miRNAs diferencialmente expressos (DE) para valores de p foram ajustados para múltiplos testes usando a taxa de descoberta falsa (FDR, do inglês *False Discovery Rate*).

Utilizando a ferramenta mirPath v.3 da base de dados Diana Tools (“DIANA TOOLS - Software”, [s.d.]), para inferência de alvos de miRNAs. Utilizamos os 24 microRNAs diferencialmente expressos entre os casos de pRC e Doença Residual (DR) para mapear os mecanismos moleculares envolvidos com estes microRNAs.

Para análise de correlação da expressão de todos os genes do transcriptoma humano com os 24 miRNAs DE, utilizamos o banco de dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA). Os dados normalizados de expressão gênica global (RNAseq) e de miRNAs (miRNAseq) que são publicamente disponíveis no repositório do GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Consideramos uma correlação significativa (Pearson) os casos com $r < -0.3$ e o valor de p ajustado pelo FDR < 0.05 .

Utilizamos a ferramenta multiMiR (RU et al., 2014) para prever e validar as interações miRNA-mRNA propostas pela análise de correlação anterior. Esta ferramenta utiliza uma série de bases de dados (miRecords, miRTarbase, TarBase, Diana tools, EIMMo, MicroCosm, miRanda, miRDB, PicTar, PITA e TargetScan) para a inferência estatística.

Os dados clínicos das pacientes com câncer de mama do TCGA foi obtido online do cBioPortal for Cancer Genomics (“cBioPortal for Cancer Genomics”, [s.d.]) no item “Breast invasive carcinoma (TCGA, Provisional)” (<https://www.cbioportal.org/>). Os dados referentes ao estágio tumoral da doença foram convertidos para 1ª edição do AJCC (American Joint on Cancer) (CARR, 1977) para normatização. O status da expressão final da proteína HER2 foi baseado na score da imuno-histoquímica (IHQ) e o resultado do FISH (hibridização in situ por fluorescência). Consideramos positivo os casos com IHQ 3+ ou casos com IHQ 2+ e FISH positivo. As pacientes foram consideradas em menopausa quando havia feito ooforectomia bilateral ou com casos com mais de 12 de amenorreia. As informações referentes ao grau tumoral, foram retiradas do artigo de Yujing Heng e colaboradores, 2017 (HENG et al., 2017). Os dados de expressão de proteínas (*Reverse Phase Protein Array* - RPPA) no tumor referentes às pacientes com câncer

de mama do TCGA foram utilizados para análise da proteína ERALPHA, para confirmarmos o status dos receptores de estrógeno. Para isso utilizamos a curva ROC para determinarmos o ponto de corte o ERALPHA e o ER estimado pelo IHQ. Para verificarmos a correlação entre a mutação no *TP53* e miR-519a, utilizamos os dados do MAF (do inglês *Mutation Annotation Format*) da base de dados do TCGA.

A análise da associação da expressão dos miRNAs com as características clínicas foi feita utilizando o teste t de Student para variáveis binárias e paramétricas, e ANOVA para variáveis maiores que dois grupos e paramétricas. O teste de Wilcoxon foi utilizado para variáveis binárias e não-paramétricas e o teste de Kuskal-Wallis foi utilizado para variáveis maiores que dois grupos e não-paramétricas. Aplicamos também o teste qui-quadrado para encontrarmos o valor da dispersão para duas variáveis categóricas nominais.

5. RESULTADOS

5.1. Características das pacientes

Dentre as pacientes que se enquadram no projeto proposto, a média de idade das mesmas é de $52,6 \pm 9,6$ anos sendo que 18 delas estão na menopausa. A média do maior diâmetro clínico do tumor primário foi de $5,6 \pm 3$ cm. Segundo as características patológicas, a maioria dos CDI foi classificada como grau II (21). Cinco tumores foram classificados como grau I e sete como grau III. Em 15 e 19 tumores encontramos expressão positiva do receptor de estrogênio e de progesterona respectivamente. A superexpressão do HER2 foi encontrada em 15 dos tumores. (Tabela 1)

Tabela 1. Característica clínicas dos pacientes com câncer de mama

	Número de casos
Idade (média)	$52,6 \pm 6,6$ anos
Menopausa	18
Grau Histológico	
I	5
II	21
III	7
Diâmetro clínico do tumor primário	$5,6 \pm 3$ cm
Receptor de Estrógeno	15
Receptor de Progesterona	19
Receptor de HER2	15
pCR	10

Tabela 1 Característica Clínica dos pacientes com carcinoma de mama localmente avançados do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

5.2. Expressão diferencial de miRNAs no câncer de mama

Fizemos a análise da expressão diferencial de 384 miRNAs das 33 amostras de tecido de câncer de mama avançados de pacientes submetidas à QTNA utilizando o kit TaqMan® Low Density Arrays (TLDA). A análise identificou 24 miRNAs DE (let-7a, let-7c, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-125a-3p, miR-125a-5p, miR-127, miR-132, miR-182, miR-193a, miR-210, miR-221, miR-330, miR-331, miR-495, miR-512, miR-517a, miR-517c, miR-519a, miR-532, miR-628). A análise integrativa para identificação de vias de sinalização celular identificou quatorze miRNAs relacionados às vias de sinalização relacionadas ao câncer (let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-125a, miR-182, miR-193a, miR-221, miR-330, miR-331, miR-532 e miR-628). Os miRNAs let-7a e miR-182 estão relacionados com a desregulação transcricional do câncer. Dez miRNAs estão envolvidos no ciclo celular (let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-132, miR-182, miR-221, miR-519a) e os miR-20b, miR-182, miR-221, miR-331 estão envolvidos nas vias de sinalização do estrogênio e prolactina. Oito miRNAs estão relacionadas com vias de sinalização da proteína p53 (let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-182, miR-221) e da ECM (miR-29c, miR-127, miR-193a, miR-330, miR-331, miR-512, miR-532 e miR-628). Os miRNAs miR-20b, miR-23b, miR-127 e o let-7a estão envolvidos na via de sinalização do TGF- β . E seis miRNAs (let-7c, miR-210, miR-495, miR-517a, miR-517c, miR-519a) não foram identificadas vias de sinalização significantes.

A Tabela 2 resume as vias de sinalização relacionadas com os 18 miRNAs DE nos casos de resposta patológica à quimioterapia no câncer de mama.

Tabela 2. Análise de vias de sinalização dos 24 miRNAs diferencialmente expressos

Vias de sinalização	miRNAs
Relacionados a algum tipo de câncer	Let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-125a, miR-182, miR-193a, miR-221, miR-330, miR-331, miR-519a, miR-532, miR-628
Vias moleculares do câncer	Let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-182, miR-193a
Desregulação transcricional em câncer	Let-7a, miR-182
Ciclo celular	Let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-132, miR-221, miR-182, miR-519a
Vias de sinalização do estrogênio e prolactina	miR-20b, miR-182, miR-221, miR-331
Vias de sinalização da proteína p53	Let-7a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-107, miR-182, miR-221
Vias de sinalização da proteína ECM	miR-29c, miR-127, miR-193a, miR-330, miR-331, miR-512, miR-532, miR-628
Via de sinalização do TGF- β	miR-20b, miR-23b, miR-127, let-7a, miR-132

Tabela 2 Vias de sinalização dos miRNAs diferencialmente expressos utilizando a base de dados Diana tools e miRWalk.

5.3. Classificação molecular baseada na expressão de miRNAs

Realizamos a análise de clusterização hierarquizada em 33 amostras de câncer de mama utilizando a expressão dos 24 miRNAs DEs. Observamos que as amostras tumorais se agrupam em dois grandes grupos. (Figura 2) Os miRNAs miR-

127, miR- Let-7c, miR-495, miR-107, miR-23a, miR-Let-7a, miR-132, miR-29c, miR-532, miR-20b, miR-221 estão superexpressos no cluster associado com maior taxa de resposta patológica completa ($p=0.0084$). Neste cluster existe um maior número de tumores ER- e grau 2 ($p =0.8803$ e $p=0.865$, respectivamente).

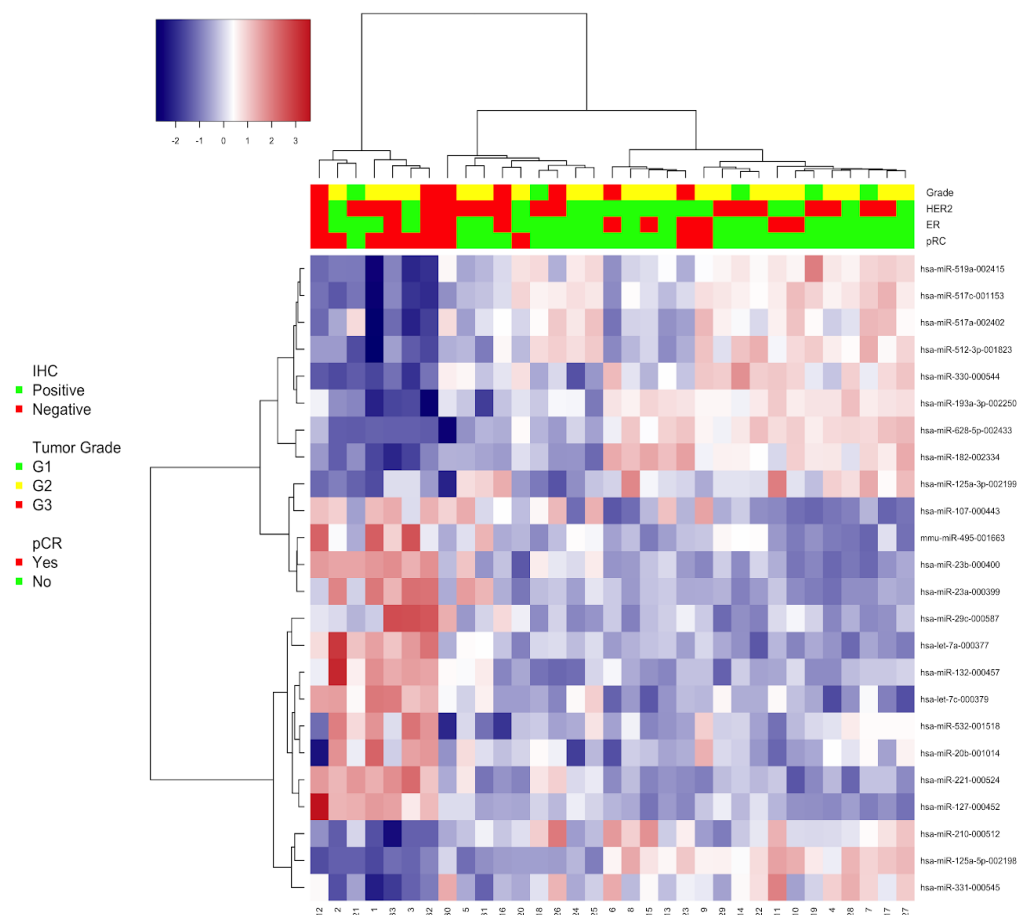


Figura 2 Heatmap da análise da expressão diferencial dos miRNAs e dos parâmetros clínico – patológicos dos pacientes com carcinoma de mama do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

5.4. Correlação entre miRNAs-RNAm alvos

Obtivemos 5155 potenciais alvos significativos baseados na correlação entre a expressão dos miRNAs e mRNAs no banco de dados do TCGA. Encontramos 62 potenciais interações validadas e preditas envolvendo 9 miRNAs (miR-532, miR-23a, let-7a, miR-210, miR-182, let-7c, miR-519a, miR-107, miR-628) (Anexo 1). Utilizando o pacote miRmapper para analisar as interações obtidas, observamos

que os miRNAs miR-532, miR-23a, Let-7a são os mais associados com alvos em comum (Figura 3).

5.5. Análise comparada entre amostras tumorais e mama normal (TCGA)

Comparamos a expressão dos 24 miRNAs entre amostras de tecido normal e tecido tumoral pareadas de câncer de mama do banco de dados do TCGA e identificamos que os miRNAs let-7a, let-7c, miR-107, miR-182, miR-210, miR-628 estão diferencialmente expressos. miR-519a está expresso somente em tecido tumoral. A sua expressão é positiva em aproximadamente 63% das neoplasias malignas investigadas. (Figura 4)

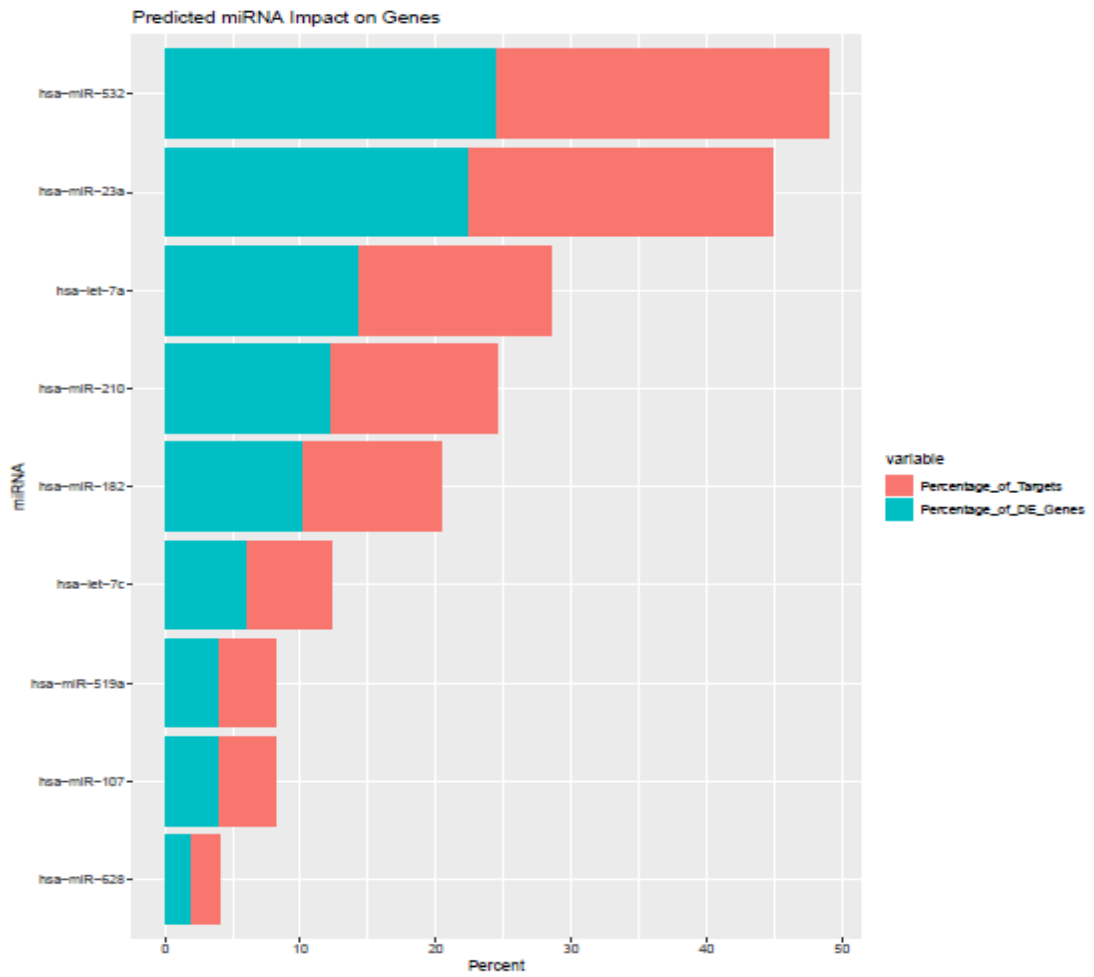


Figura 3 Barplot onde os dados são apresentados na ordem do maior número de genes impactados para o menor, com a porcentagem de alvos totais afetados pelo miRNA em vermelho e a porcentagem do total de genes DE afetados pelo miRNA em azul. (ferramenta miRmapper)

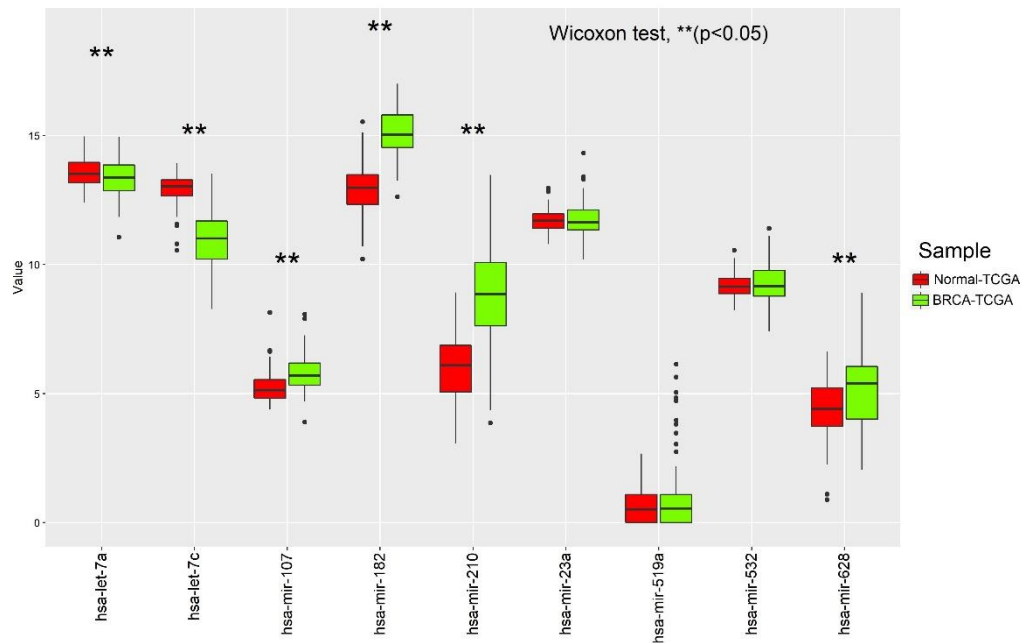


Figura 4 Boxplot do teste não-paramétrico e pareado de Wilcoxon entre as amostras de tecido normal e tumoral –BRCA dos pacientes do TCGA (** = $p < 0,05$) (n=103)

5.6. Análise do miR-519a associado às características clínicas

Para melhor investigar a apresentação bimodal da expressão do miR-519a, utilizamos dados clínicos, patológicos e moleculares disponíveis no banco de dados do TCGA. Encontramos que a expressão deste miRNA está altamente associado à tumores RE negativos ($p = 2.20e-16$), ao subtipo Basal-like ($p = 2.20e-16$), tumores de alto grau histológico ($p = 2.20e-16$) e ao subtipo intClust 10 ($p < 2.20e-16$). A sua expressão não está associada com o estágio da doença (Tabela 3, Anexos 2-5).

No Banco de dados HCRP (n=33), o miR-519a estava altamente expresso em tumores de pacientes do grupo RD (Figura 5). No entanto, não encontramos diferença na expressão do miR-519a com o RE ($p = 0.09$), e a expressão em tumores de alto grau estava significativamente menor que em tumores não alto grau ($p = 0.03$). De acordo com o score de Allred, a IHQ para RE deve ser considerada positiva para escores ≥ 3 , que contemplam amostra com pelo menos 1% de células tumorais com marcação positiva fraca para RE. Nas amostras do banco de dados

HCRP não temos informações sobre a porcentagem e a intensidade da marcação na IHQ para RE. No entanto, em 644 amostras do TCGA existem informações sobre a porcentagem de marcação.

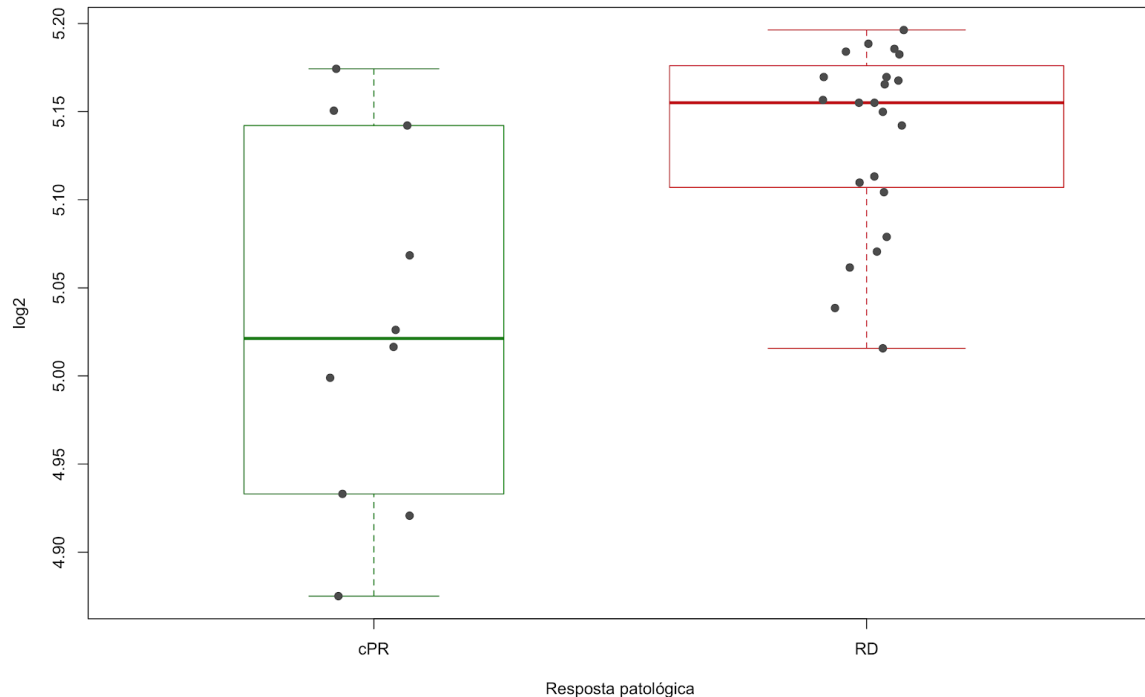


Figura 5 Expressão do miR-519a (RT-PCR em tempo real) em pacientes com resposta patológica completa (cPR) e doença residual (RD) após a quimioterapia primária ($p = 0.003$) ($n = 33$).

Nós investigamos a relação entre a IHQ e a expressão do RE utilizando dados de RPPA do banco de dados do TCGA, onde a expressão da proteína (ERALPHA) é uma variável quantitativa. De uma forma geral, existe uma forte associação entre as duas variáveis ($p < 0.0001$). No entanto, existe uma inconsistência entre a expressão do ERALPHA com a IHQ em casos com baixa porcentagem de células positivas para RE. Note na Figura 6 que, existe amostras com baixa expressão (<10% incluindo os casos RE negativos) que a proteína ERALPHA está altamente expressa. Adicionalmente, os casos com expressão positiva entre 10-19% tem uma alta expressão. Para melhor investigar a associação da expressão do miR-519a e a expressão do RE, utilizamos dados do RPPA do TCGA. Nós observamos que existe uma fraca anti-correlação ($\rho = -0.35$, $p < 0.001$) entre a expressão do miR-519a e a proteína ERALPHA (Figura 7).

BRCA - TCGA: Análise comparativa da expressão da proteína ERalpha e a IHQ para RE (n= 644)

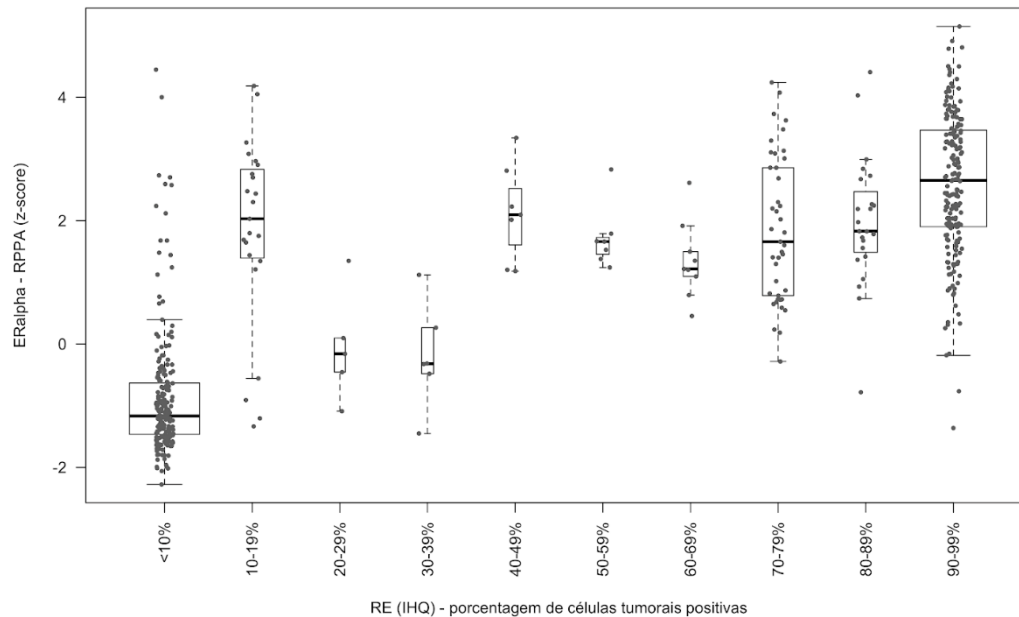


Figura 6 Análise comparativa da expressão da proteína ERALPHA (RPPA) e a porcentagem de células positivas para RE na IHQ das amostras do TCGA.

Para investigarmos os potenciais alvos (RNAm) que o miR-519a regula, buscamos nas bases de dados Diana tools, TargetScan, miRWalk e miRTarBase e na literatura. Como resultado da correlação de Spearman entre esse miRNA e seus possíveis alvos, encontramos que esse miRNA possui interações descritas com os genes *PTEN* ($\rho = -0.09$, $p = 0.010$), *AKT3* ($\rho = -0.104$, $p = 0.002$), *CDKN1A/p21* ($\rho = -0.040$, $p = 0.236$), *PARP1* ($\rho = 0.119$, $p = 0.024$), *PPP2CA* ($\rho = -0.24$, $p = 5.35E-16$), *ZCCHC10* ($\rho = -0.25$, $p = 2.25E-16$). Com base nos resultados do multiMiR identificamos dois alvos preditos para o miR-519a, os genes *PPP2CA* e o *ZCCHC10*. Ao investigarmos esses dois genes na literatura, encontramos que estão relacionados a proteína p53. Para verificarmos a correlação entre o gene *TP53* e miR-519a, utilizamos os dados do MAF (do inglês *Mutation Annotation Format*) da base de dados do TCGA. Identificamos que em amostras que apresentam mutação no gene *TP53*, o miR-519a está superexpresso ($p = 0.00012$). (Figuras 08 e 09) Como o *TP53* está envolvido no controle da apoptose (JAN; CHAUDHRY, 2019), investigamos a expressão deste miRNA com algumas proteínas-chaves relacionadas a cascata de apoptose. Identificamos que a alta expressão do miR-519a está associada a baixa expressão das proteínas BCL2, FASN e alta expressão da proteína CASPASE3, apesar de possuírem uma baixa correlação ($\rho = -0.1784$,

$p= 1.43E-07$; $\rho=-0.1676$, $p= 7.89E-07$; $\rho= 0.08207$, $p= 0.0162$, respectivamente)
(Figuras 10, 11,12).

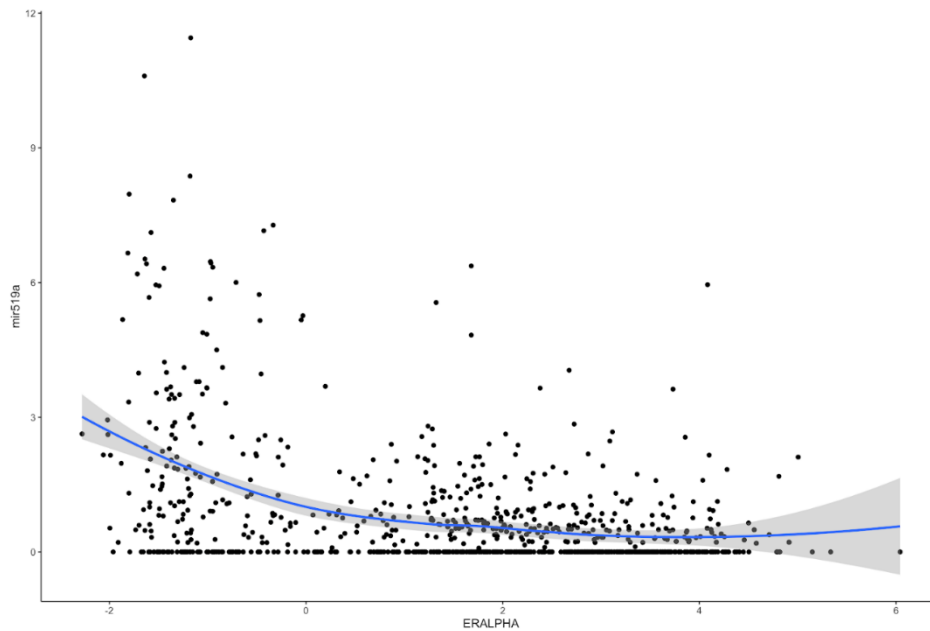


Figura 7 Expressão do miR-519a e da proteína ERalpha (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.35$, $p < 0.0001$), ($n=1078$).

Tabela 3 Associação entre a expressão do miR-519 e parâmetros clínicos e moleculares do banco de dados do TCGA (teste de Kruskal-Wallis)

Variável	Mediana	IQR	p
Estágio tumoral			0.3644
Estágio I	0.31	0.93	
Estágio II	0.33	1.09	
Estágio III	0.11	0.84	
Estágio IV	0	0.64	
Grau tumoral			1.33E-09
Grau 1	0.19	0.74	
Grau 2	0	0.67	
Grau 3	0.59	2.03	
IntClust			2.20E-16
iC1	0	0.78	
iC2	0	0.36	
iC3	0.1	0.84	
iC4	0.12	0.84	
iC5	0.36	1.23	
iC6	0	0.56	
iC7	0.24	0.68	
iC8	0	0.52	
iC9	0.27	1.1	
iC10	2	3.76	
Subtipo tumoral			2.20E-16
Basal	2.05	3.52	
Her2	0.45	1.24	
LumA	0	0.64	
LumB	0	0.6	

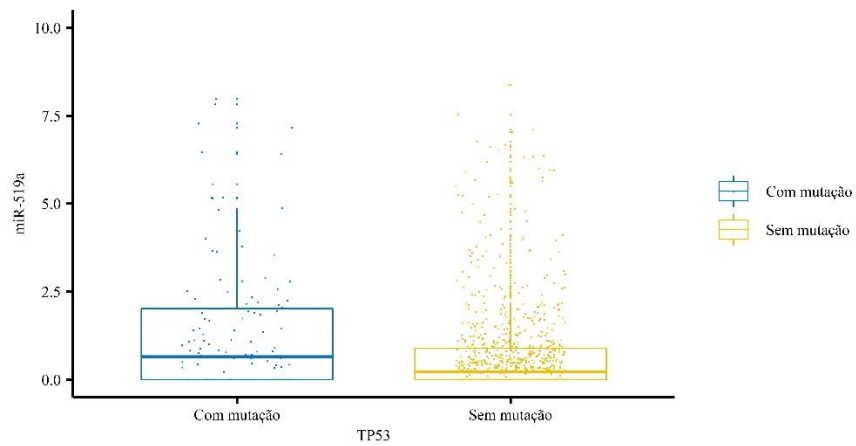


Figura 8 Expressão do miR-519a em relações amostras que apresentam ou não mutações somáticas no gene TP53 em carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. ($p= 0.00018$), ($n=1060$)

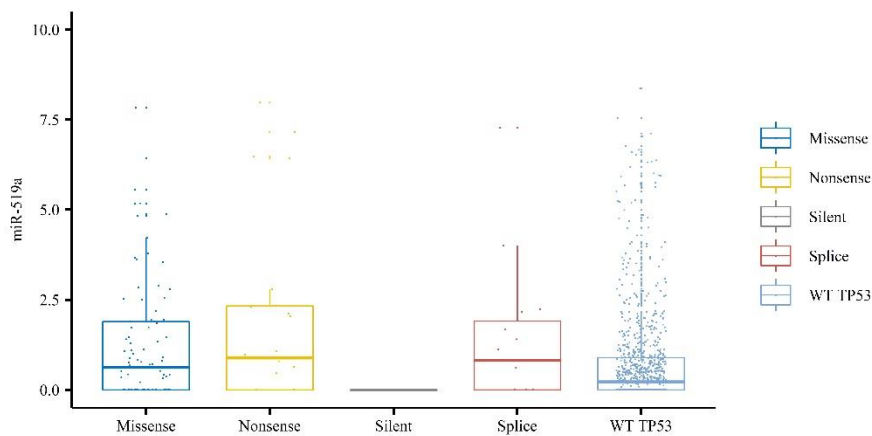


Figura 9 Expressão do miR-519a em relação as mutações e wild type do gene TP53 em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA ($n=133$).

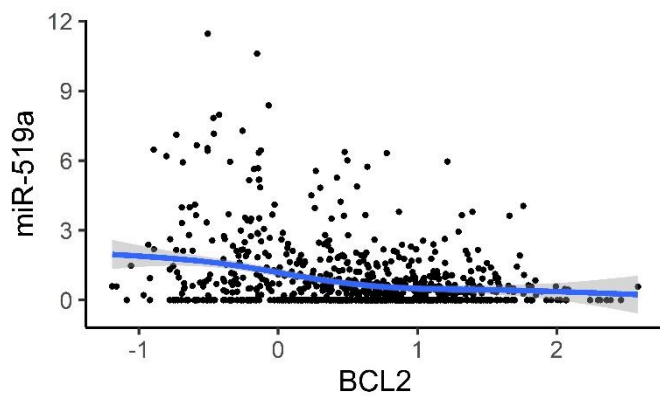


Figura 10 Expressão do miR-519a e da proteína BCL2 (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.18$, $p = 1.432e-07$), ($n = 1078$).

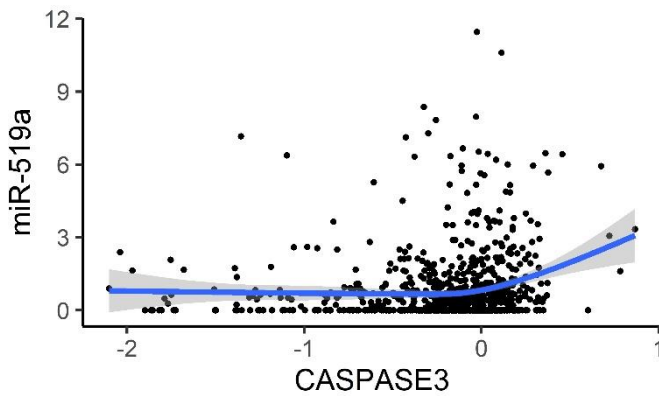


Figura 11 Expressão do miR-519a e da proteína CASPASE 3 (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.082$, $p = 0.0162$), ($n = 1078$).

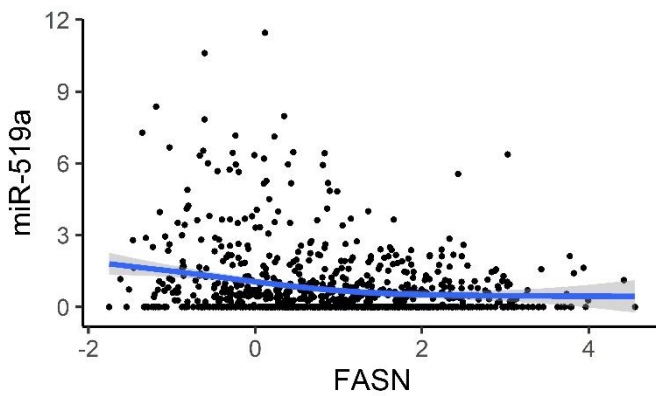


Figura 12 Expressão do miR-519a e da proteína FASN (RPPA) em amostras de carcinoma de mama do banco de dados do TCGA. Existe uma fraca anti-correlação entre as variáveis ($\rho = -0.17$, $p = 7.888e-07$), ($n = 1078$).

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comum e uma das principais causas de morte de mulheres no mundo (CHEN et al., 2019; GONG et al., 2018; ZHANG et al., 2017). É uma doença com características heterogêneas, pois é possível encontrar divergências entre os carcinomas mamários a nível molecular, histopatológico e clínico (AURE et al., 2017). A heterogeneidade intrínseca às neoplasias malignas da mama e a variabilidade interpessoal na modulação da resposta imune torna a identificação de marcadores de resposta e fatores de prognóstico no câncer de mama uma atividade desafiadora (LUENGO-GIL et al., 2019).

Expressão desregulada de miRNAs, pode alterar a proliferação celular, promover invasão, metástase, apoptose em células cancerígenas. Por essa razão, podem ser usados como preditores de prognóstico e diagnóstico do câncer (EGELAND et al., 2015). Em nosso estudo identificamos 24 miRNAs diferencialmente expressos em tumores de paciente sem resposta ao tratamento com quimioterapia primária. A análise de clusterização baseada na expressão dos 24 miRNAs permite classificar os tumores em dois grupos. Esta classificação está associada com a resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante e é um potencial modelo preditivo de resposta. Estudar a fundo os mecanismos de ação e integração desses miRNAs pode trazer informações relevantes quanto aos mecanismos de resistência à quimioterapia no câncer de mama.

Nós realizamos uma análise integrativa da expressão de miRNAs e mRNAs derivados do banco de dados do TCGA, identificamos que o miR-519a está expresso somente no tecido tumoral e tem uma associação com a falta de expressão do RE na neoplasia. No banco de dados do HCRP, a expressão do miR-519a está fortemente associada com resistência à quimioterapia. A resistência parece estar associada com tumores RE positivos e negativos.

miR-519a é um oncomir que foi relacionado a resistência a apoptose, viabilidade celular e progressão do ciclo celular (BREUNIG et al., 2017; EGELAND et al., 2015). Breuning e colaboradores, 2017 demonstraram que o miR-519a pode regular a apoptose de células de câncer de mama. Pois confere resistência a morte celular programada de células tumorais e a evasão das células cancerígenas da

resposta imune (células Natural Killer (NK)) (BREUNIG et al., 2017). No entanto, esse miRNA não estava associado a nenhuma via ligada ao câncer, quando fizemos a análise *in silico* no banco de dados DIANATOOLS. Mas, ao investigarmos os possíveis alvos (RNAm) desse miRNA em diferentes bases de dados e na literatura, encontramos que o miR-519a possui interações com os genes *PTEN*, *AKT3*, *CDKN1A/p21*, *PARP1*, *PPP2CA*, *ZCCHC10*, porém apresentam uma correlação fraca.

O miR-519a foi demonstrado como regulador do gene *PTEN*, que regula negativamente a via PI3/Akt/mTor. Que por sua vez, controla o fator de crescimento responsável pela metástase e pela resistência a drogas quimioterápicas, em células cancerígenas. Nesse sentido, a superexpressão desse miRNA aumenta a resistência a drogas e a probabilidade de enviar metástase (HU et al., 2018). Em outros estudos o miR-519a foi validado como modulador da expressão dos genes *PTEN*, *RB1* e *CDKN1A/p21*, *TRAIL* e da via do PI3K/Akt (BREUNIG et al., 2017; EGELAND et al., 2015; WARD et al., 2014).

Em nosso estudo o resultado da predição no multiMiR (RU et al., 2014), apresentou dois alvos para o miR-519a, os genes *PPP2CA* e *ZCCHC10*. Ambos os genes apresentam correlação negativa com o miR-519a, o que significa que possuem uma expressão inversamente proporcional, ou seja, quando o microRNA está hiperexpresso o gene está hipoexpresso e vice-versa.

ZCCHC10 (*zinc finger CCHC-type containing 10*), gene localizado no cromossomo 5q31. Essa região gênica é descrita como alvo frequente de deleções e variações no perfil de metilação no câncer. Esse gene foi estudado em melanoma, câncer gástrico e leucemia mieloide e em câncer de pulmão foi descrito como co-ativador da proteína p53. Foi identificado como supressor tumoral, inibidor de proliferação celular, de formação de colônia, migração e invasão celular (NING et al., 2019; OHIRA et al., 2019).

A proteína PPP2CA (subunidade catalítica da proteína fosfatase 2 alfa), também chamada de PP2Ac (“Home - PubMed - NCBI”, [s.d.]; MACDONALD et al., 2019). É uma proteína nuclear regulatória de uma série de processos fisiológicos e patológicos. Ela regula a proliferação e diferenciação celular, apoptose, carcinogênese, desfosforilação protéica (BÉGHIN et al., 2008; LI et al., 2014; MCDONALD et al., 2014). A PPP2CA é considerado um supressor tumoral, e foi estudada em câncer de mama (BÉGHIN et al., 2008; JIANG et al., 2017; LI et al.,

2014), como desfosforiladora da p53 (BÉGHIN et al., 2008) e é também modulada pela progesterona (MCDONALD et al., 2014).

O gene *TP53*, tem sido bastante estudado por ser um supressor tumoral e regulador do ciclo celular. Encontra-se mutado em mais de 50% dos casos de câncer humano (ELMORE, 2007). *TP53* pode induzir ao reparo do DNA, interrompendo o ciclo celular temporariamente na fase G1 (quiescência). Quando o dano é irreversível, esse gene induz a célula a autodestruição (ELMORE, 2007; GARIBALDI et al., 2016). O miR-519a já foi descrito, em diferentes tipos de câncer, como hiporegulado quando o gene *TP53* está mutado (GARIBALDI et al., 2016). Entretanto, miR-519d, micronucleotídeo da família do miR-519a, foi encontrado superexpresso quando o *TP53* também estava com alta expressão (FORNARI et al., 2012).

Breunig e colaboradores, 2017, identificaram que em câncer de mama ER negativo está fortemente associado a mutações no *TP53*. Identificaram também a hiperexpressão do miR-519a em carcinoma mamário associada ao gene *TP53* mutado (BREUNIG et al., 2017). Em nosso estudo, utilizando a base de dados do TCGA com pacientes com câncer de mama, encontramos também a associação do miR-519a a mutações no *TP53* (Figuras 08 e 09). Como o *TP53* está fortemente envolvido no controle da apoptose (JAN; CHAUDHRY, 2019), analisamos a expressão deste miRNA com algumas proteínas-chaves relacionadas a cascata de apoptose. Identificamos que o miR-519a está superexpresso enquanto as proteínas BCL2, FASN apresentam hipoexpressão e CASPASE3 apresenta hiperexpressão. (Figuras 11,12,13)

A análise de expressão do RE pela IHQ é um exame rotineiro na prática clínica. É descrito na literatura que algumas neoplasias apresentam uma baixa taxa de positividade (1%-10%) (JORNS; HEALY; ZHAO, 2013). Do ponto de vista clínico e para predição de benefício do uso de terapia hormonal anti-estrogênica, é utilizado o escore de Allred (ALLRED, 2004). A hormonioterapia adjuvante é indicada em casos com escore ≥ 3 , que representa qualquer marcação em pelo menos 1% das células tumorais. Esta conduta é baseada na observação de ganho de sobrevida nesta situação. No entanto, ao considerar a expressão positiva do RE em situações de baixa taxa de positividade pode gerar resultados falso-negativo (HAMMOND et al., 2010). Em nosso estudo com os pacientes da base de dados do TCGA,

encontramos, em alguns tumores, a alta expressão do ER- α analisado pelo RPPA, quando possuem expressão baixa ou negativa do RE, na IHQ (Figura 06).

Em alguns estudos com pacientes com câncer de mama, a expressão do miRNA miR-519a foi associada a tumores RE+ e a baixa sobrevida dos pacientes (EGELAND et al., 2015; WARD et al., 2014). Em outro estudo com câncer de mama, feito por Breunig e colaboradores, 2017, a ausência da expressão do RE está associada a alta expressão do miR-519a, e ao alto grau histológico tumoral (BREUNIG et al., 2017). A associação desse microRNA com prognóstico também foi descrito em câncer de ovário. A alta expressão está associado com redução de sobrevida dos pacientes (KIM et al., 2010). Em nosso estudo, o miR-519a está hiperexpresso em amostras de tumores RE- no banco de dados do TCGA. Todavia, há uma fraca anti-correlação entre a expressão miR-519a e do ERALPHA, sugerindo que este miRNA não está associado diretamente com o controle da expressão do receptor de estrógeno. No banco de dados do HCRP, não encontramos diferença estatística entre o miR-519a e o RE. A diferença da expressão do miR-519a com o RE, entre os dados dos pacientes do HCRP e TCGA, pode ter sido influenciada pela discrepância entre as expressões do ERALPHA e do RE pelo IHQ identificado na figura 6.

O subtipo intCluster10 é considerado uma doença agressiva e de mau prognóstico. Esses tumores são tipicamente do subtipo Basal (PAM50) e triplo negativos (MUKHERJEE et al., 2018; RUEDA et al., 2019). Em nosso estudo, encontramos que as pacientes classificadas com iClust10, na base de dados TCGA apresentam alta expressão do miR-519a. A prevalência de mutação somática no *TP53* neste subtipo tumoral é da ordem de 29%. Estas observações sugerem que o miR-519a possa estar envolvido com a modulação da expressão gênica em carcinomas de mama de mau prognóstico.

Identificamos em nosso estudo que a resposta patológica à quimioterapia primária está associada a diferentes padrões de expressão de miRNAs no tumor. O perfil de expressão de 24 miRNAs é um potencial modelo preditivo de resposta à quimioterapia em tumores avançados da mama. Estudar a fundo os mecanismos de ação e integração desses miRNAs pode trazer informações relevantes quanto aos mecanismos de resistência à quimioterapia no câncer de mama. A análise *in silico* de um grande número de amostras do câncer de mama identificou o miR-519a

como um potencial alvo de investigação clínica. Este miRNA está superexpresso em câncer de mama com os subtipos tumorais basal-like e intClust10. Ele possui como alvos os genes *PPP2CA* e o *ZCCHC10*, que estão diretamente associados a vias de sinalização do *TP53*. A alta expressão do miR-519a foi encontrada em carcinomas de mama com mutação somática do *TP53*. Adicionalmente, encontramos que tumores sem resposta à quimioterapia apresentam alta expressão do miR-519a. Assim, podemos inferir o miR-519a e seus alvos como possíveis preditores de prognóstico e alvo terapêutico em câncer de mama.

6. CONCLUSÃO

A análise de clusterização baseada na expressão dos 24 miRNAs permite classificar os tumores em dois grupos. Esta classificação está associada com a resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante. Adicionalmente, identificamos 6 miRNAs que apresentaram diferença estatística quando comparamos tecido normal e tumoral (Let-7a, Let-7c, miR-107, miR-182, miR-210, miR-682). O miR-519a apresenta expressão apenas em tumores de câncer de mama, quando comparada ao tecido normal da mama. A expressão deste miRNA está associada aos subtipos tumorais basal-like e intClust 10 e a também a mutação do gene TP53.

Encontramos que os alvos do miRNA miR-519a são os genes *PPP2CA* e o *ZCCHC10*, que estão associados a vias relacionadas a proteína p53. Como essa proteína está envolvida no controle da apoptose, identificamos a associação deste miRNA com algumas proteínas ligadas a cascata de apoptose. Podemos, dessa forma, inferir que essa associação pode ser secundária as mutações da p53.

Estudar a fundo os mecanismos de ação e integração desses miRNAs pode trazer informações relevantes quanto aos mecanismos de resistência à quimioterapia no câncer de mama. O miRNA miR-519a e seus alvos são potenciais moduladores das vias carcinogênicas e podem ser uma fonte de investigação adicional como possível biomarcador. Contudo, a associação do miRNA, seus alvos mRNA e a resposta à quimioterapia no câncer de mama não foram profundamente investigadas, sugerimos que novos estudos devam ser desenvolvidos a fim de dar continuidade a esses achados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 33, 2 out. 2017.

ALLRED, D. C. **Breast Cancer Update .com - Web Guide 7**. Disponível em: <<http://www.breastcancerupdate.com/bcu2004/7/allred.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

ASIAF, A. et al. MicroRNAs in Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Potential. In: [s.l.] Humana Press, New York, NY, 2018. p. 23–43.

AURE, M. R. et al. Integrative clustering reveals a novel split in the luminal A subtype of breast cancer with impact on outcome. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, 29 mar. 2017.

BANIN HIRATA, B. K. et al. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Disease markers**, v. 2014, p. 513158, 2014.

BECKER, C. et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 237–243, abr. 2010.

BÉGHIN, A. et al. Expression of Arl2 is associated with p53 localization and chemosensitivity in a breast cancer cell line. **Cell Cycle**, v. 7, n. 19, p. 3074–3082, 1 out. 2008.

BOLLIG-FISCHER, A. et al. Modeling time-dependent transcription effects of HER2 oncogene and discovery of a role for E2F2 in breast cancer cell-matrix adhesion. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 21, p. 3036–43, 1 nov. 2014.

BREUNIG, C. et al. MicroRNA-519a-3p mediates apoptosis resistance in breast cancer cells and their escape from recognition by natural killer cells. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 8, 3 ago. 2017.

CARR, D. T. The manual for the staging of cancer. **Annals of Internal Medicine**, v. 87, n. 4, p. 491–492, 1977.

cBioPortal for Cancer Genomics. Disponível em: <<https://www.cbioportal.org/>>. Acesso em: 4 dez. 2019.

CECILIO, A. P. et al. Breast cancer in Brazil: Epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 43–49, 29 jan. 2015.

CHEN, W.-X. et al. Bioinformatics analysis revealing prognostic significance of RRM2 gene in breast cancer. **Bioscience reports**, v. 39, n. 4, 30 abr. 2019.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346–352, 21 jun. 2012.

DE MATTOS-ARRUDA, L. et al. The Genomic and Immune Landscapes of Lethal Metastatic Breast Cancer. **Cell reports**, v. 27, n. 9, p. 2690- 2708.e10, 28 maio 2019.

DIANA TOOLS - Software. Disponível em: <<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/page&view=software>>. Acesso em: 4 dez. 2019.

DÍAZ- CASAS, S. E. et al. Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy and the Molecular Classification of Locally Advanced Breast Cancer in a Latin American Cohort. **The Oncologist**, p. theoncologist.2019-0300, 25 jul. 2019.

DVINGE, H. HTqPCR - high-throughput qPCR analysis in R and Bioconductor. **Bioconductor version: Release (2.10)**, 2010.

EGELAND, N. G. et al. **The role of microRNAs as predictors of response to tamoxifen treatment in breast cancer patients** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 14 out. 2015.

ELMORE, S. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death** *Toxicologic Pathology* NIH Public Access, , 2007.

FERRACIN, M. et al. Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 16, p. 14545–55, 10 jun. 2015.

FIROUZABADI, D. et al. Association of ki67 and tumor marker p53 in locally advanced breast cancer patients and evaluation of response to neoadjuvant chemotherapy: a survey in South Iran. **Cancer management and research**, v. 11, p. 6489–6497, 2019.

FITZGIBBONS, P. L. et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 138, n. 5, p. 595–601, 2014.

FORNARI, F. et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. **Journal of Pathology J Pathol**, v. 227, p. 275–285, 2012.

GARIBALDI, F. et al. Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex Percolation properties of amino acid networks View project p53, chaperones and cancer View project. 2016.

Global Cancer Observatory. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

GONG, M.-T. et al. Comprehensive integrated analysis of gene expression datasets identifies key anti-cancer targets in different stages of breast cancer. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 2, p. 802–810, ago. 2018.

HAMMOND, M. E. H. et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784–2795, 2010.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 18 mar. 2017.

HENG, Y. J. et al. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes. **The Journal of Pathology**, v. 241, n. 3, p. 375–391, fev. 2017.

HIRONAKA-MITSUHASHI, A. et al. A tissue microRNA signature that predicts the prognosis of breast cancer in young women. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187638,

2017.

Home - PubMed - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

HU, W. et al. Functional miRNAs in breast cancer drug resistance. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 1529–1541, 2018.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **INCA - CÂNCER - Tipo - Mama.** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>.

IWASAKI, T. et al. Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 4, p. 1543–1550, 1 abr. 2015.

JAN, R.; CHAUDHRY, G. E. S. **Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics** *Advanced Pharmaceutical Bulletin* Tabriz University of Medical Sciences, , 2019.

JIANG, Y. et al. Cysteine transporter slc3a1 promotes breast cancer tumorigenesis. **Theranostics**, v. 7, n. 4, p. 1036–1046, 2017.

JORNS, J. M.; HEALY, P.; ZHAO, L. Review of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER-2/neu Immunohistochemistry Impacts on Treatment for a Small Subset of Breast Cancer Patients Transferring Care to Another Institution. **Arch Pathol Lab Med**, v. 137, p. 1660–1663, 2013.

KIM, T. H. et al. Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. **Histopathology**, v. 57, n. 5, p. 734–743, nov. 2010.

KLEIN, J. et al. Locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and adjuvant radiotherapy: a retrospective cohort analysis. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 306, 3 dez. 2019.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 3 dez. 1993.

LI, J. et al. Stable SET knockdown in breast cell carcinoma inhibits cell migration and invasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 1, p. 7–12, 10 out. 2014.

LI, Z. et al. Global Analysis of miRNA-mRNA Interaction Network in Breast Cancer with Brain Metastasis. **Anticancer research**, v. 37, n. 8, p. 4455–4468, 1 ago. 2017.

LIU, R.; GUO, C.-X.; ZHOU, H.-H. Network-based approach to identify prognostic biomarkers for estrogen receptor-positive breast cancer treatment with tamoxifen. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 2, p. 317–24, 2015.

LÜ, L. et al. MicroRNAs in the prognosis of triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 22, p. e7085, jun. 2017.

LUENGO-GIL, G. et al. Clinical and biological impact of miR-18a expression in

breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Cellular Oncology**, v. 42, n. 5, p. 627–644, 1 out. 2019.

MACDONALD, T. M. et al. Prolactin-inducible EDD E3 ubiquitin ligase promotes TORC1 signalling, anti-apoptotic protein expression, and drug resistance in breast cancer cells. **American journal of cancer research**, v. 9, n. 7, p. 1484–1503, 2019.

MCDONALD, W. J. et al. Progesterone-inducible EDD E3 ubiquitin ligase binds to $\alpha 4$ phosphoprotein to regulate ubiquitination and degradation of protein phosphatase PP2Ac. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 254–261, 25 jan. 2014.

MISHRA, S. et al. Circulating miRNAs revealed as surrogate molecular signatures for the early detection of breast cancer. **Cancer Letters**, v. 369, n. 1, p. 67–75, 1 dez. 2015.

MUKHERJEE, A. et al. Associations between genomic stratification of breast cancer and centrally reviewed tumour pathology in the METABRIC cohort. **npj Breast Cancer**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2018.

NING, Y. et al. ZCCHC10 suppresses lung cancer progression and cisplatin resistance by attenuating MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 6, p. 414, 28 jun. 2019.

OHIRA, T. et al. PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 2019.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v. 24, p. S26–S35, 1 nov. 2015.

R CORE DEVELOPMENT TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **Vienna, Austria**, 2019.

RAKHA, E. A.; GREEN, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 111–119, fev. 2017.

RITCHIE, M. E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, 2015.

ROYCHOWDHURY, M. **Pathology Outlines - Hormone receptors**. Disponível em: <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignanthormonereceptors.html>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

RU, Y. et al. The multiMiR R package and database: Integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations. **Nucleic Acids Research**, 2014.

RUEDA, O. M. et al. **Dynamics of breast-cancer relapse reveal late-recurring ER-positive genomic subgroups** Nature Publishing Group, , 21 mar. 2019.

SELLI, C.; SIMS, A. H. **Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer as a Model for Translational Research** Breast Cancer: Basic and Clinical Research SAGE

Publications Ltd, , 1 fev. 2019.

SUBBIAH, S. et al. Molecular subtypes as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Indian journal of cancer**, v. 54, n. 4, p. 652–657, 2017.

SUN, C.-C. et al. Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for E2Fs in Human Breast Cancer. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 6, p. 1153–1165, 5 jun. 2019.

SWELLAM, M. et al. Potential diagnostic role of circulating MiRNAs in breast cancer: Implications on clinicopathological characters. **Clinical Biochemistry**, v. 56, p. 47–54, 1 jun. 2018a.

SWELLAM, M. et al. Role of some circulating MiRNAs on breast cancer diagnosis. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–9, 20 jun. 2018b.

TIEZZI, D. G. et al. Current Breast Cancer Screening Scenario in Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 41, n. 11, p. 633–635, 19 nov. 2019.

VIMALRAJ, S. et al. Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs. **Disease markers**, v. 35, n. 5, p. 369–87, 2013.

VON MINCKWITZ, G. et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 7, p. 617–628, 14 fev. 2019.

WARD, A. et al. MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. **Journal of Pathology**, v. 233, n. 4, p. 368–379, 2014.

WARD, W. H. et al. Preoperative Delays in the Treatment of DCIS and the Associated Incidence of Invasive Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, 2019.

YAMADA, Y. et al. Regulation of HMGB3 by antitumor miR-205-5p inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in prostate cancer pathogenesis. **Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 2, p. 195–205, 1 fev. 2018.

ZHANG, S. et al. Role of high mobility group A1 and body mass index in the prognosis of patients with breast cancer. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5719, nov. 2017.

ZHU, W. et al. Dynamics of circulating microRNAs as a novel indicator of clinical response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Cancer medicine**, v. 7, n. 9, p. 4420–4433, set. 2018.

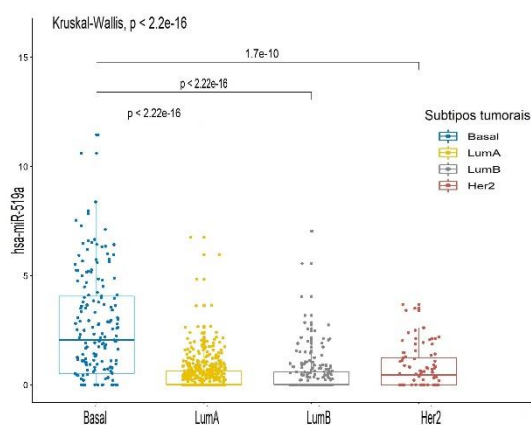
ANEXOS

Anexo1. Predição miRNA-alvos

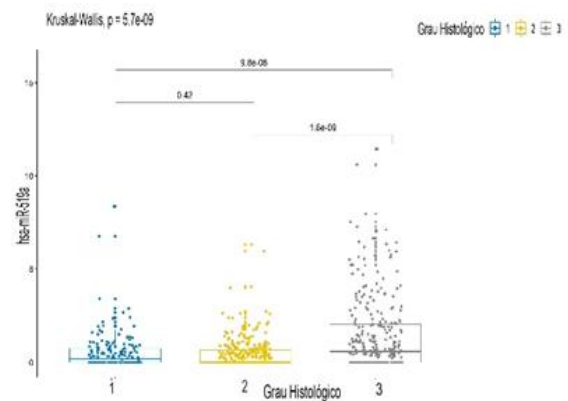
miRNAs	target_symbol	database	type
hsa-let-7a	HMGA1	mirtarbase	validated
hsa-let-7a	HMGA1	elmmo	predicted
hsa-let-7a	HMGA1	pita	predicted
hsa-let-7a	HMGA1	targetscan	predicted
hsa-let-7a	SUV39H2	targetscan	predicted
hsa-let-7a	CCNF	targetscan	predicted
hsa-let-7a	C11orf84	elmmo	predicted
hsa-let-7a	RRM2	mirtarbase	validated
hsa-let-7a	RRM2	elmmo	predicted
hsa-let-7a	RRM2	targetscan	predicted
hsa-let-7a	CBX2	elmmo	predicted
hsa-let-7a	CBX2	targetscan	predicted
hsa-let-7a	AURKB	mirtarbase	validated
hsa-let-7c	STRBP	elmmo	predicted
hsa-let-7c	NIPA1	elmmo	predicted
hsa-let-7c	NIPA1	targetscan	predicted
hsa-let-7c	BRI3BP	mirtarbase	validated
hsa-miR-107	GNG12	mirtarbase	validated
hsa-miR-107	ZBTB38	mirtarbase	validated
hsa-miR-182	MPP1	elmmo	predicted
hsa-miR-182	MPP1	targetscan	predicted
hsa-miR-182	MSN	miranda	predicted
hsa-miR-182	MSN	pita	predicted
hsa-miR-182	CHST11	elmmo	predicted
hsa-miR-182	MAF	elmmo	predicted
hsa-miR-210	APBB3	mirtarbase	validated
hsa-miR-210	MEF2D	mirtarbase	validated
hsa-miR-210	SCN7A	mirtarbase	validated
hsa-miR-210	GIGYF1	mirtarbase	validated
hsa-miR-210	BTG2	mirtarbase	validated
hsa-miR-210	BTG2	mirdb	predicted
hsa-miR-210	COL14A1	mirtarbase	validated
hsa-miR-23a	NPDC1	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	LMX1B	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	MTG1	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	RGS12	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	C21orf2	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	WDR90	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	PNPLA2	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	BRF1	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	C20orf96	microcosm	predicted

hsa-miR-23a	GATA3-AS1	microcosm	predicted
hsa-miR-23a	PRRT1	microcosm	predicted
hsa-miR-519a	PPP2CA	mirtarbase	validated
hsa-miR-519a	ZCCHC10	miranda	predicted
hsa-miR-532	FGF14	targetscan	predicted
hsa-miR-532	CPEB3	miranda	predicted
hsa-miR-532	CCNG1	targetscan	predicted
hsa-miR-532	STC2	targetscan	predicted
hsa-miR-532	RAI2	microcosm	predicted
hsa-miR-532	RAI2	miranda	predicted
hsa-miR-532	RAI2	pita	predicted
hsa-miR-532	TBX3	miranda	predicted
hsa-miR-532	GFRA1	targetscan	predicted
hsa-miR-532	SLC25A46	mirdb	predicted
hsa-miR-532	NEGR1	pita	predicted
hsa-miR-532	DALRD3	microcosm	predicted
hsa-miR-532	FAM47E	miranda	predicted
hsa-miR-532	ACADSB	mirtarbase	validated
hsa-miR-628	RAB24	microcosm	predicted

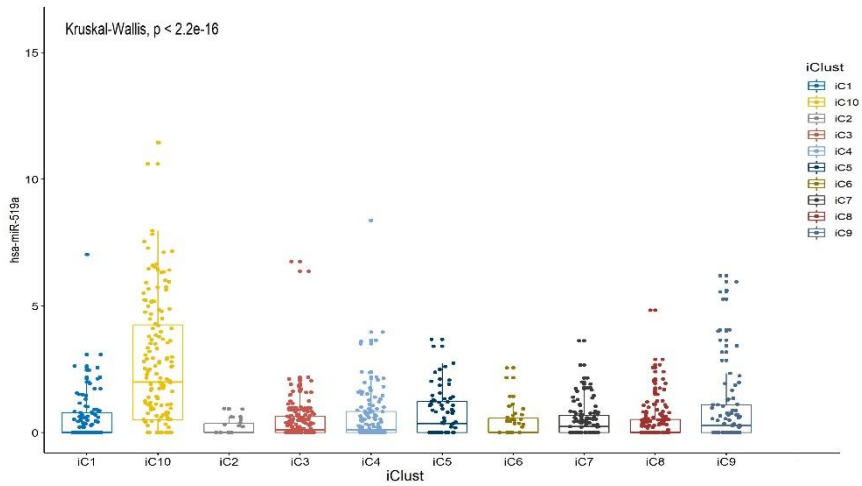
Anexo 1. Predição miRNA-alvos de diversos bancos de dados, através da ferramenta MultiMir no R



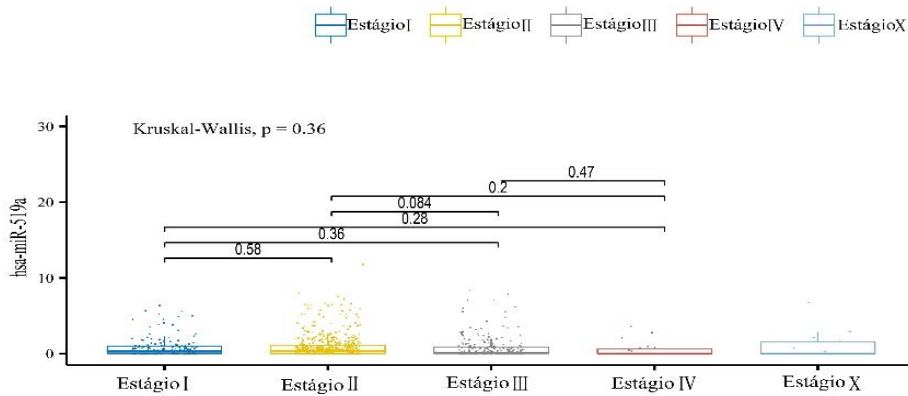
Anexo 3 Expressão do miR-519a em relação aos subtipos tumorais do câncer de mama dos pacientes do TCGA



Anexo 2 Expressão do miR-519a em relação aos graus histológicos do câncer de mama dos pacientes do TCGA



Anexo 4 Expressão do miR-519a em relação aos subtipos do iClust de câncer de mama dos pacientes do TCGA



Anexo 5 Expressão do miR-519a em relação aos estágios tumorais do câncer de mama dos pacientes do TCGA