

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS SANTANA DE LIMA



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LONGOS RNAs NÃO CODIFICANTES EM
LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

CURITIBA

2017

THAIS SANTANA DE LIMA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LONGOS RNAs NÃO CODIFICANTES EM
LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia, ao curso de Ciências Biológicas, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniela Fiori Gradia

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Doutora Daniela Fiori Gradia, que me concedeu a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, me orientou de forma dedicada contribuindo para a minha formação e também para meu crescimento pessoal.

A minha família, principalmente aos meus pais Leonir de Santana e Paulo Aparecido de Lima que sempre estiveram presentes, zelando por mim e fazendo tudo para me proporcionar condições de estudo. A minha irmã Ana Paula de Lima e ao meu cunhado Leandro Alenski por toda ajuda e apoio emocional.

Ao meu amor Fabio Nagata por todo apoio, carinho, amor e dedicação ao longo de todos esses anos, pelas experiências, pela superação das dificuldades e pelos momentos maravilhosos que compartilhamos.

Aos amigos que fiz durante o curso, em especial ao meu grande amigo Filipe Apolinário dos Anjos por todo o companheirismo e bons momentos compartilhados, tanto na vida acadêmica quanto na pessoal e a minha querida amiga Fernanda Vitoria Buck Fonseca por todas as risadas e palavras de incentivos.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, que me acolheram e que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de ensino e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

Agradeço também a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal.

A Deus, pois sem ele nada eu poderia realizar.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais comum entre mulheres. É uma doença bastante heterogênea que possui variações moleculares tanto entre subtipos tumorais quanto dentro de um mesmo tumor. Estas características dificultam o diagnóstico, prognóstico e abordagem terapêutica. Entender os mecanismos moleculares por trás da heterogeneidade do câncer de mama ainda é um desafio e encontrar biomarcadores para aperfeiçoar o diagnóstico e terapia, apresenta grande importância. Neste sentido, uma classe de moléculas tem chamado atenção por participar na regulação da expressão gênica e em um amplo conjunto de processos biológicos, os longos RNAs não codificantes (lncRNAs). lncRNAs são uma classe grande e diversificada de RNAs, que também podem atuar ativamente em todas as etapas da carcinogênese, funcionando como oncogenes ou supressores de tumor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de diferentes lncRNAs em linhagens tumorais de carcinoma mamário. Para esse trabalho, seis linhagens tumorais de mama, além da linhagem normal foram cultivadas e a partir delas foi feita extração de RNA e síntese de cDNA. Partindo de uma análise global da expressão de lncRNAs em câncer de mama, foram selecionados três lncRNAs para avaliar seu nível expressão nas diferentes linhagens tumorais. A análise da expressão gênica foi realizada a partir da técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR) e o método de análise usado foi o cálculo do $\Delta\Delta Ct$. Os resultados mostraram que os lncRNAs selecionados apresentaram expressão diferencial entre as linhagens. Os lncRNAs NORAD e NEAT1_1 apresentaram baixa expressão na maioria das linhagens, o lncRNA AC008771.1, ainda sem informações na literatura, apresentou expressão aumentada em relação à linhagem normal em duas linhagens: BT474 (Luminal B) e MCF-7 (Luminal A). Essas linhagens representam os subtipos mais comuns de câncer de mama e encontrar marcadores que sejam específicos para determinado subtipo acelera o processo de diagnóstico e terapia, entretanto, os mecanismos de ação deste lncRNA ainda são desconhecidos. A identificação de lncRNAs como potenciais biomarcadores e/ou alvos moleculares abre novas possibilidades na conduta diagnóstica e terapêutica do câncer de mama.

Palavras-Chave: Câncer de mama. Longo RNA não codificante. Regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

Breast cancer is second most frequent neoplasm in the world and the most common among women. It is a very heterogeneous disease that has molecular variations both between tumor subtypes and within a same tumor. These characteristics make diagnosis, prognosis and therapeutic approach difficult. Understanding the molecular mechanisms behind the heterogeneity of breast cancer is still a challenge and finding biomarkers to improve diagnosis and therapy, show great importance. A class of molecules have attracted attention for participating in the regulation of gene expression and in a broad set of biological processes, the long noncoding RNA (lncRNAs). lncRNAs are a large and diverse class of RNAs, which can also act actively at all stages of carcinogenesis, functioning as oncogenes or tumor suppressors. The aim of this work was to evaluate the expression of different lncRNAs in breast cancer cell lines. In this work, six tumoral cell line of breast cancer were cultured, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Starting from a global analysis of the expression of lncRNAs in breast cancer, we selected three lncRNAs to evaluate their expression level in different tumoral cell lines. Gene expression analysis was performed using the quantitative real-time PCR technique (qRT-PCR) and the method of analysis used was the $\Delta\Delta C_t$. The results showed that the selected lncRNAs presented differential expression between lineages. The NORAD and NEAT1_1 lncRNAs showed low expression in most lineages. The lncRNA AC008771.1, still without information in the literature, presented increased expression in relation to the normal lineage in two cell lines: BT474 (Luminal B) and MCF-7 (Luminal A). These lineages represent the most common subtypes of breast cancer and finding markers that are specific for a particular subtype speeds up the process of diagnosis and therapy, however, the mechanisms of action of this lncRNA is still unknown. In this way, further studies are needed to discover the role of this lncRNA in breast cancer. The identification of lncRNAs as potential biomarkers and / or molecular targets opens new possibilities in the diagnostic and therapeutic management of breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Long non-coding RNA. Regulation of gene expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	10
2.2	MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	11
2.3	ASPECTOS CLÍNICOS DO CÂNCER DE MAMA.....	13
2.4	CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DO MAMA.....	14
2.5	RNAs NÃO CODIFICANTES.....	19
2.6	RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES.....	22
2.7	LncRNAs NO CÂNCER.....	25
3	JUSTIFICATIVA	28
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBEJTIVO GERAL.....	28
4.2	OBEJTIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	CULTIVO CELULAR.....	28
5.2	EXTRAÇÃO DE RNA.....	30
5.3	SÍNTESE DE cDNA.....	30
5.4	SELEÇÃO DOS lncRNAs.....	31
5.5	EFICIÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (<i>PRIMERS</i>).....	32
5.6	QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

6.1	VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	34
6.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO.....	35
7	CONCLUSÃO	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias que mais acometem os seres humanos, o câncer de mama aparece em segundo lugar (WHO, 2017). De acordo com recentes estatísticas mundiais do câncer, mais de 1.675.000 mulheres são diagnosticadas com câncer de mama a cada ano e mais de 500.000 acabam morrendo (FERLAY *et al.*, 2012). O câncer de mama é uma neoplasia complexa que ocorre quando existe um crescimento anormal das células do tecido mamário. Apresenta uma grande heterogeneidade em suas características morfológicas, genéticas, fenotípicas e comportamentais (AL TAMIMI *et al.*, 2010). Entender os mecanismos moleculares por trás da heterogeneidade do câncer de mama é ainda hoje, grande desafio para aperfeiçoar o diagnóstico e terapia.

O avanço da biologia molecular permitiu maior compreensão dos genomas. Hoje se sabe que apenas 2% do genoma humano são genes codificadores de proteínas, enquanto que pelo menos 90% são transcritos em RNA não codificantes (ncRNA). Dentre os ncRNAs estão alguns RNAs bem conhecidos, como o RNAs transportadores (tRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNAs), RNAs ribossômicos (rRNAs), micro RNAs (miRNAs) e um grande grupo de longos RNAs não codificantes (lncRNAs) (VIKRAM *et al.*, 2014). Os lncRNAs são um grupo importante de ncRNAs, cuja função em diversos processos biológicos, bem como a participação no processo de oncogênese vem sendo elucidado.

Os lncRNAs desempenham um papel fundamental em processos celulares, incluindo o crescimento celular, regulação da expressão gênica em nível transcricional e pós-transcricional e carcinogênese (ZHANG *et al.*, 2014; HANSJI *et al.*, 2014). Alguns trabalhos sugerem que os lncRNAs exercem funções essenciais no desenvolvimento do tumor mamário (GUPTA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011), que podem ter potencial aplicação como biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e como possíveis alvos terapêuticos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o nível de expressão de lncRNAs, previamente selecionados por meio de banco de dados, que estão relacionados ao câncer de mama em linhagens de células mamárias normais e em diferentes linhagens de células mamárias tumorais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais comum entre mulheres, depois do câncer de pele não melanoma (INCA, 2017). Afeta mais de 1,5 milhão de mulheres por ano e corresponde como a principal causa de morte por câncer entre mulheres em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Em 2015, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 570.000 mulheres vieram a óbito em decorrência do câncer de mama, isso equivale a aproximadamente 15% de todas as mortes por câncer entre mulheres (SIEGEL *et al.*, 2016; WHO, 2017).

Embora a incidência de câncer de mama seja maior em alguns países desenvolvidos (MAHSHID *et al.*, 2016), a mortalidade das pacientes vem diminuindo, principalmente pelo aumento da detecção da doença em estágios iniciais e também pela conscientização da doença entre as mulheres (LOUWMAN *et al.*, 2008). Por outro lado, estatísticas globais revelam que 60% das mortes relacionadas ao câncer de mama estão ocorrendo em países economicamente em desenvolvimento, como o Brasil (JEMAL *et al.*, 2011), onde foram estimados para os anos de 2016 e 2017, cerca de 57.960 novos casos da doença, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016). Essas variações entre a incidência e taxas de mortalidade refletem as diferenças de detecção precoce e os fatores de risco associados ao câncer de mama (TORRE *et al.*, 2015).

Dentre os fatores de risco elencados para o desenvolvimento do câncer de mama, a idade é colocada como um dos principais. Entretanto o histórico reprodutivo e hormonal da mulher (menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, uso de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e idade da primeira gestação), histórico familiar de câncer de mama, bem como modificações na dieta e na prática de exercícios físicos que estão diretamente relacionadas com estilo de vida, também compõem os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama (INCA, 2017).

2.2 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A mama estruturalmente é formada pelo estroma, constituído por tecido conjuntivo, tecido adiposo, vasos sanguíneos e linfáticos, que apresenta a função de sustentação da mama e, pelo parênquima, um epitélio secretor composto de ductos, lobos e lóbulos que se formam a partir do mamilo e se espalham de maneira radial pelo estroma. Os ductos e alvéolos são revestidos internamente por células luminiais, responsáveis pela síntese e passagem do leite durante a gestação e lactação, e externamente por uma camada de células mioepiteliais basais, que formam os elementos contrácteis que permitem o transporte de leite ao longo do sistema de dutos (BIRNBAUM *et al.*, 2004; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008) (FIGURA 1).

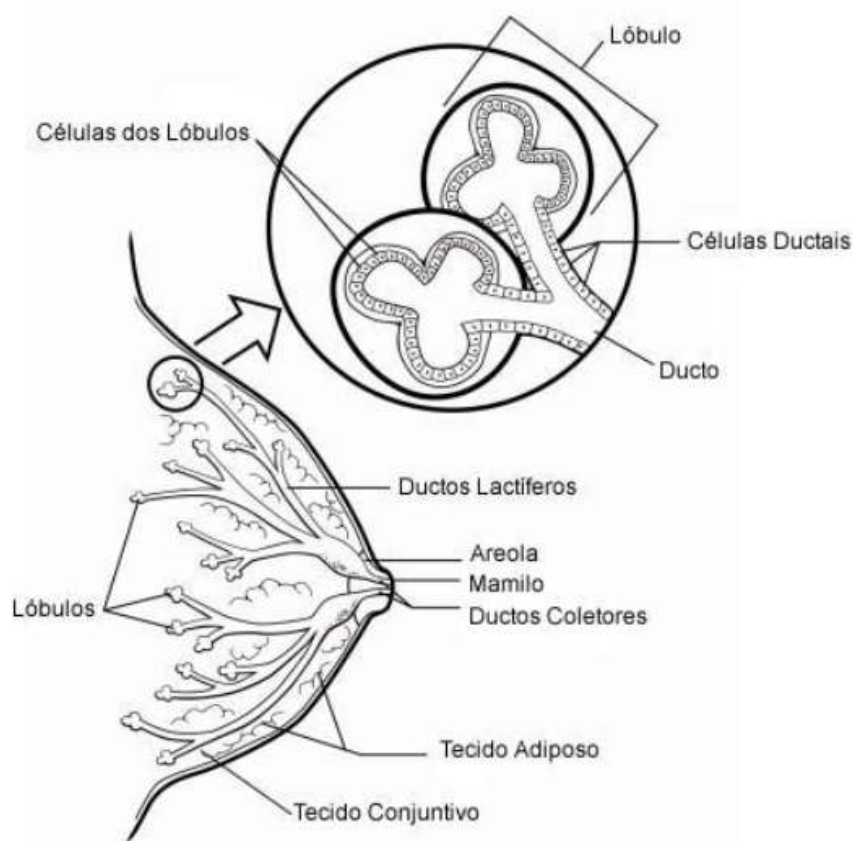


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA INTERNA DA MAMA. FONTE: Adaptado de ACS, 2010, disponível em: <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/OverviewGuide/breast-cancer-overview>.

Células-tronco epiteliais mamárias também fazem parte da constituição da mama. Presentes em menor número, estas células estão situadas predominantemente nos ductos (VILLADSEN *et al.*, 2007) e são capazes de originar células luminiais e mioepiteliais, além de formar novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (DONTU *et al.*, 2003; ALLRED *et al.*, 2004; STINGL & CALDAS, 2007). Acredita-se que “células-tronco tumorais”, são células que darão origem ao tumor, estas células apresentam características semelhantes às células tronco normais, entretanto um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas nestas células lhes confere maior capacidade de proliferação, invasão e metástases (TANG, 2012), tornando-as sítios de origem de neoplasia (HENNIGHAUSEN & ROBINSON, 2005; LaBARGE *et al.*, 2007), que podem seguir duas vias de evolução: a mioepitelial que dá origem aos tumores de subtipo basal, e a luminal-glandular que dá origem aos tumores de subtipo luminal (FIGURA 2) (VARGO-GOGOLA & ROSEN, 2007).

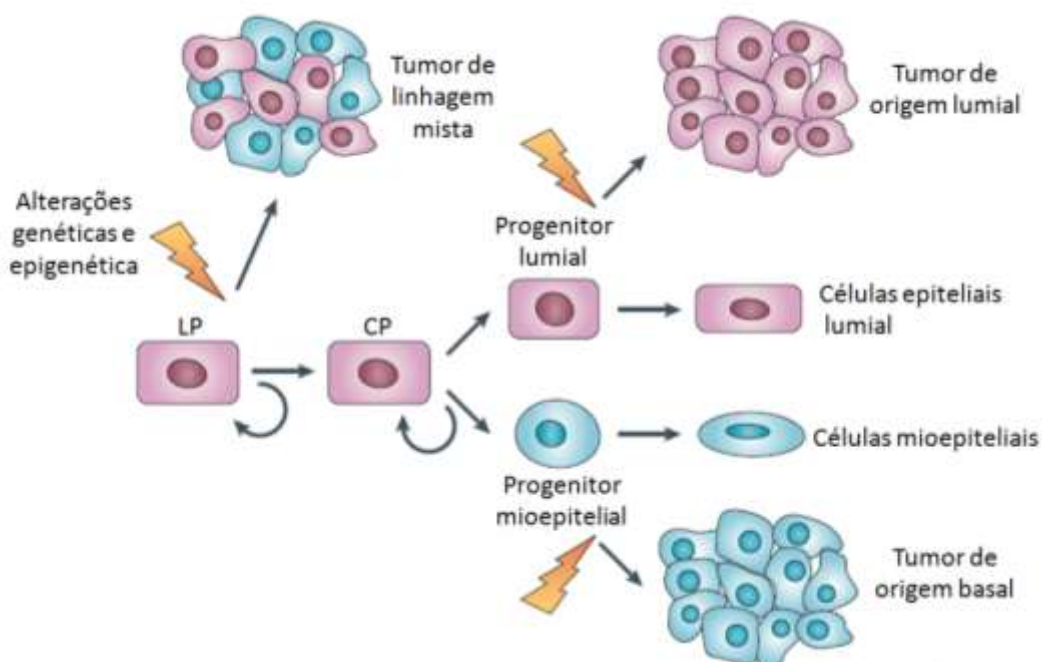


FIGURA 2. HIPÓTESE DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM CÉLULAS-TRONCO OU CÉLULAS PROGENITORAS. Alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em células-tronco ou progenitoras de longo prazo (LP) dão origem a tumores de linhagem mista, enquanto que em progenitores luminal ou basal (mioepitelial) derivadas de progenitores de curto prazo (CP) dão origem a diferentes tumores que consistem em linhagem luminal ou basal. FONTE: Adaptado de VARGO-GOGOLA & ROSEN, 2007.

Dessa forma, o desenvolvimento de neoplasias mamárias é consequência de uma variedade de alterações genéticas e epigenéticas em células normais. Entretanto estas alterações não são restritas às células que darão origem ao tumor, alterações também são observadas em células que interagem com o tumor, como as células do sistema imune, do sistema vascular e do estroma (BALMAIN *et al.*, 2003).

A susceptibilidade da glândula mamária à tumorigênese também está associada à biologia de seu desenvolvimento. No decorrer do desenvolvimento feminino, estas glândulas são expostas a estimulações cíclicas de hormônios, seu tamanho aumenta durante a gravidez e atingem o máximo no período da amamentação. Esses conjuntos de modificações fisiológicas e morfológicas que incluem a morfogênese ductal, lactação e involução da mama, podem favorecer o estímulo de alterações em mecanismos que regulam o modelamento da mama, podendo resultar em um processo de malignização das células (BISSEL & RADISK, 2001).

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença heterogênea em relação às alterações moleculares, à composição celular e aos aspectos clínicos, possui uma etiologia bem variada e pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais. Seu desenvolvimento se dá, na maioria das vezes, por mutações em células epiteliais que revestem os ductos e lóbulos mamários, dando origem aos carcinomas ductais (CD) e lobulares (CL), respectivamente (TIEZZ, 2009).

O primeiro evento que ocorre no processo de formação de carcinoma é a hiperplasia, processo no qual as células epiteliais sofrem modificações morfológicas, (ainda sem atipia citológica), apresentam poucas alterações genéticas e o aumento de células nesta fase ainda é autolimitado. Com a progressão da doença, as lesões pré-cancerosas passam a apresentar elevada taxa de divisão celular e já pode ser observado certo grau de atipia citológica. A progressão dessas lesões pode levar para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), onde a atipia citológica torna-se proeminente, há um alto índice de taxa mitótica e alterações genéticas frequentes

são mas ainda encontram-se delimitadas pela membrana basal (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

O carcinoma *in situ* é considerado o primeiro estágio de classificação do câncer. Neste estágio as células cancerosas estão restritas à camada de tecido na qual se desenvolveram e não se espalham para tecidos (INCA, 2012). Dentro desse grupo está o carcinoma ductal *in situ* (CDIS), o tipo de carcinoma não invasivo mais comum. Nele, a proliferação de células do epitélio ductal maligno não invade o tecido normal por estarem limitadas pela membrana dos ductos (OREL *et al.*, 1997). O CDIS apresenta uma incidência cerca de 23% dos tumores de mama identificados, já os carcinomas lobulares *in situ* (CLIS) correspondem à cerca de 3% das pacientes (MAKKI, 2015).

Nos carcinomas invasivos, ao contrário do *in situ*, as células cancerosas rompem a membrana basal e invadem outras camadas celulares do órgão, ganham a corrente sanguínea ou linfática e apresentam a capacidade de se disseminar para outras partes do corpo dando início ao processo de metástases (BATEMAN, 2007). O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo mais comum de câncer de mama, representando cerca de 65% a 80% de todos os casos diagnosticados, pode apresentar variação de tamanho e de consistência. O carcinoma lobular invasor (CLI) abrange aproximadamente 10% de todos os carcinomas de mama diagnosticados (EHEMAN *et al.*, 2009; THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2015; FERLAY *et al.*, 2012).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

Rotineiramente diversos fatores clínicos e patológicos são utilizados para caracterizar tumores de pacientes com câncer de mama, principalmente com o objetivo de identificar o tipo de tumor, avaliar também o progresso da doença e determinar a terapia adequada. Fatores como: a idade da paciente, a presença de metástases nos linfonodos axilares, o tamanho do tumor e características histológicas são utilizadas para fazer o diagnóstico e determinar o estadiamento de tumores. A classificação morfológica dos tumores mamários é obtida de acordo com

seu grau e tipo histológico, presença de invasão linfo-vascular e metástase para linfonodos (SCHNITT, 2010).

O grau de diferenciação histológica avalia principalmente o pleiomorfismo nuclear, a formação do túbulo/glândula e atividade mitótica para carcinomas invasivos. Esses critérios representam uma correlação das estruturas morfológicas dos tumores com seu grau de malignidade, ou seja, o grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando a capacidade de metastatização. Dessa forma consideram-se os tumores em: grau I são bem diferenciados e com melhor prognóstico, grau II são moderadamente diferenciados e grau III são pouco diferenciados e com pior prognóstico (OLDENBURG et al., 2007).

A classificação de tumores mamários pelo sistema TNM, baseia-se nos principais atributos morfológicos de tumores malignos, que são determinados clínica e histopatologicamente. Os parâmetros avaliados são: extensão do tumor primário (T), presença e extensão de metástases em linfonodos regionais (N) e a presença de metástases à distância (M). Esses parâmetros recebem graduações, normalmente de T0 a T4, N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. A partir desse sistema é possível determinar o estadiamento do câncer de mama (QUADRO 1) (GIULIANO et al., 2017).

QUADRO 1. CLASSIFICACAO DOS TUMORES MAMÁRIOS DE ACORODO COM O SISTEMA TNM.

Classificação	Definição
<i>Tumor primário (T)</i>	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Tis (CLIS)	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
TIs (Paget)	Doença de Paget não associada a carcinoma invasivo e/ou <i>in situ</i>
T1	Tumor com < 2 cm
T1mic	≤ 0,1 cm (microinvasão)
T1a	> 0,1 a 0,5 cm
T1b	> 0,5 a 1 cm
T1c	> 1 a 2 cm
T2	> 2 a 5 cm
T3	> 5 cm
T4a	Tumor de qualquer tamanho com extensão para a parede torácica, sem incluir o músculo peitoral
T4b	Tumor de qualquer tamanho com ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites ou edema
T4c	T4a e T4b associados

T4d	Carcinoma inflamatório
<i>Linfonodo regional (N)</i>	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex: previamente removidos)
N0	Não há evidência de metástase em linfonodo
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N2a	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais fixados a outro linfonodo ou outra estrutura
N2b	Metástase apenas em nodos mamários ipsilaterais internos aparentes e ausência de evidencia clinica de metástase em linfonodos axilares
N3a	Metástase para linfonodos infraclaviculares ipsilaterais
N3b	Metástase para linfonodos mamários internos ipsilaterais e para linfonodos axilares
N3c	Metástase para linfonodos supraclaviculares ipsilaterais
<i>Metástase (M)</i>	
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Não há evidências de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância (incluindo linfonodos supraclaviculares)

FONTE: Adaptado de GIULIANO *et al.*, 2017.

A classificação morfológica por meio de parâmetros clínicos (grau histológico e classificação TNM), no entanto, passou a ser insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, tendo em vista a existência de diferentes aspectos histológicos, diferenças clínicas e variações de respostas aos tratamentos, refletido pela alta heterogeneidade e complexidade do câncer de mama (VAN VEER *et al.*, 2002).

As dificuldades encontradas em diferenciar morfológicamente os diferentes tipos de tumor mamário resultaram em uma nova classificação, que foi baseada no perfil de expressão gênica e diversidade fenotípica no câncer de mama (VAN VEER *et al.*, 2002). Essa classificação molecular foi proposta por um estudo pioneiro realizado por Perou e colaboradores (2000) que avaliaram a expressão de 1753 genes em 42 amostras de tecido mamário, em células cancerosas e normais.

A classificação proposta por estes autores juntamente com trabalhos subsequentes (SORLIE *et al.*, 2001; 2003), subdividiu os tumores de mama em cinco subgrupos moleculares: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal-like e semelhante ao normal, de acordo com o perfil de expressão dos receptores hormonais, como os receptores de estrógeno (RE) e os receptores de progesterona (RP), bem como a superexpressão ou amplificação do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2) e em algumas situação o receptor do fator do crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR).

O subtipo Luminal A é o mais comum entre todos, representando 50-60% dos casos de câncer, é caracterizado por apresentar fenótipo RE e RP positivos e HER2 negativos, além de baixa expressão de gene de proliferação celular. O baixo grau histológico, tumores bem diferenciados e pouca atividade mitótica conferem a esse subtipo um bom prognóstico, normalmente é utilizada a terapia hormonal (SORLIE *et al.*, 2001).

O subtipo Luminal B representa de 10-20% de todos os casos de câncer de mama. Esse subtipo apresenta positividade para os receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e na maioria das vezes HER2 apresenta-se positivo. Por possuir maior grau histológico e maior índice proliferativo, apresentam um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico em relação ao subtipo A. Os tratamentos comumente utilizados são a terapia hormonal e a quimioterapia (EROLES *et al.*, 2012).

Os tumores do subtipo HER2-enriquecido correspondem a 15-20% de todos os casos de cânceres de mama, possuem super expressão do HER2 (ErbB2) e ausência dos receptores hormonais (RE e RP) . Geralmente apresentam alto grau histológico, alto potencial proliferativo e são pouco diferenciados, tornando seu prognóstico não favorável. No entanto, apesar da falta de receptores RE e RP, os portadores destes tumores apresentam boa resposta a tratamentos com anticorpos que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o medicamento trastuzumab (BERTUCCI *et al.*, 2006; EROLES *et al.*, 2012).

O subtipo *basal-like* representa 10-20% dos tumores mamários, é caracterizado pela ausência de expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e HER2. Recebeu essa nomenclatura por apresentar um padrão de expressão similar ao observado em células do epitélio basal/mioepiteliais da mama, como a expressão do fator de crescimento epidérmico (EGFR) a P-caderina, entre outros (SORLIE *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2004). Este subtipo pode estar associado com o pior prognóstico, possui alto grau histológico e não responde bem aos tratamentos convencionais, como drogas antiestrogênicas nem como anticorpo monoclonal anti-HER2 por não possuir alvos terapêuticos definidos (VIEIRA, 2008).

O subtipo semelhante ao normal (*normal-like*) representa cerca de 5-10% de todos os carcinomas de mama. Apresentam um perfil de expressão gênica

semelhante ao das células epiteliais normais, células adiposas e outras células do estroma. Esse subtipo, em geral não expressa os três receptores (RE, RP e HER2), entretanto, não são considerados basais por não terem a expressão de EGFR e CK5 (EROLES *et al.*, 2012). Ainda não estão bem compreendidos a sua distinção e seu valor clínico, mas o seu crescimento lento e pouco agressivo o configuram com um bom prognóstico. No QUADRO 2 os tumores mamários estão classificados molecularmente de acordo com o padrão de imunomarcção para RE, RP, HER2 e EGFR.

QUADRO 2: CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS SUBTIPOS TUMORAIS DE MAMA.

Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e RP+, HER2-
Luminal B	RE+ e RP+/- , HER2+/-
HER2-enriquecido	RE- , RP- , HER2+++
<i>Basal-like</i>	RE- , RP- , HER2- , EGFR+
<i>Normal-like</i>	RE- , RP- , HER2- , EGFR

HER2 receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrógeno; RP receptor de progesterona. FONTE: O autor (2017).

Trabalhos posteriores identificaram e sugeriram mais dois subtipos. O subtipo claudina baixa é caracterizado pela baixa expressão dos genes que codificam as claudinas 3, 4 e 7, E-caderinas e CD24. Os tumores classificados neste subgrupo apresentam alta expressão de genes relacionados com a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e baixa expressão de marcadores luminais (RE, RP, CK18, CK19) (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; PRAT *et al.*, 2010; EROLES *et al.*, 2012). O outro subtipo é o de tumores apócrino molecular, caracterizados pelo aumento de expressão de receptores de androgênio (RA) e negatividade para RE e RP (CHA *et al.*, 2012; VALENTIN *et al.*, 2012; DVORKIN-GHEVA & HASSELL, 2014).

Cada um dos subtipos apresenta diferenças em relação aos fatores de risco, riscos de progressão e sítios preferenciais de metástases (POLYAK, 2011). Essa diversidade se torna um desafio para a classificação deste tipo de câncer, na predição de um prognóstico e/ou sobre o comportamento do tumor (PARKER, 2009).

A classificação molecular resultou em uma mudança na maneira de perceber o câncer de mama, possibilitando então vê-lo como um conjunto de doenças que variam entre os pacientes e que necessitam de estratégias terapêuticas distintas (REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011). Observa-se que houve um importante avanço na classificação do câncer de mama, resultando em um melhor conhecimento da doença.

Na prática clínica, no entanto, devido às dificuldades na identificação dos subtipos moleculares por meio do perfil de expressão gênica, é utilizada a técnica de imuno-histoquímica para auxiliar na identificação dos tumores, ela fornece uma classificação mais simplificada e análoga à classificação molecular (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013). Dessa forma, os tumores mamários são classificados em quatro subtipos: luminal A, luminal B, HER2 e Triplo Negativo (TN), por imuno-histoquímica para RE, RP e HER2 (QUADRO 3).

QUADRO 3: CLASSIFICAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS SUBTIPOS TUMORAIS DE MAMA.

Subtipos	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+, RP+, HER2-
Luminal B	RE+, RP-, HER2-
HER2+	RE-, RP-, HER2+++
Triplo-Negativo	RE-, RP-, HER2-

RE: receptor de estrógeno; RP receptor de progesterona; HER2 receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. FONTE: O autor (2017).

Alguns subtipos imuno-histoquímicos podem não corresponder exatamente à classificação molecular, como é o caso do grupo “Triplo-Negativo”, que engloba um grupo de heterogêneo de tumores mamários, onde o mesmo padrão de imunomarcção pode ser observado em diferentes subtipos moleculares (basal e claudina baixa). Essa classificação imuno-histoquímica permite a determinação do melhor tipo de abordagem terapêutica para cada paciente, uma vez que varreduras genéticas para o diagnóstico das pacientes individualmente, ainda são inviáveis no uso da rotina clínica, limitando o acesso devido ao seu alto custo (SCHNITT, 2010; GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; EROLES *et al.*, 2012).

2.5 RNAs NÃO CODIFICANTES

O dogma central da biologia afirma que a informação genética está essencialmente contida no DNA que é transcrito em RNA e posteriormente traduzido em proteínas. No entanto, durante várias décadas, pesquisadores notaram a existência de RNAs que não eram traduzidos, formalmente conhecido como RNAs não codificantes (ncRNAs) (WALDRON & LACROUTE, 1975). Algumas moléculas desse grupo, tais como o RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA), representam notáveis exceções para o dogma central por estarem presentes de forma abundante e por apresentarem papéis estruturais e regulatórios na maquinaria da tradução.

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são uma classe de moléculas transcritas a partir do genoma e que apresentam grande quantidade de códons de parada em suas sequências, o que significa que não apresentam regiões abertas de leitura ou ORFs (do inglês *Open Reading Frame*). São moléculas que não codificam proteínas, mas apresentam funções biológicas importantes e que não podem ser considerados apenas como intermediários entre DNA e proteínas, como anteriormente se pensava (COSTA, 2007).

Durante muito tempo, grande parte dos métodos de identificação de genes estava voltada à exploração de genes codificadores de proteínas, que são altamente expressos e conservados evolutivamente, o que levou a acreditar que a complexidade de um organismo estava diretamente correlacionada como o tamanho de seu genoma e a quantidade de genes codificantes expressos (TAFT *et al.*, 2007). Entretanto projetos de sequenciamento genômico demonstraram que apesar de 90% de o genoma humano ser transcrito, apenas 2% corresponde a transcritos gênicos que codificam proteínas (BAIRD, 2001). Evidenciando que ao contrário do que se acreditava, os organismos mais complexos possuem uma maior proporção de transcritos não codificantes em relação aos genes codificantes (BALLANTYNE, 2017) (FIGURA 3).

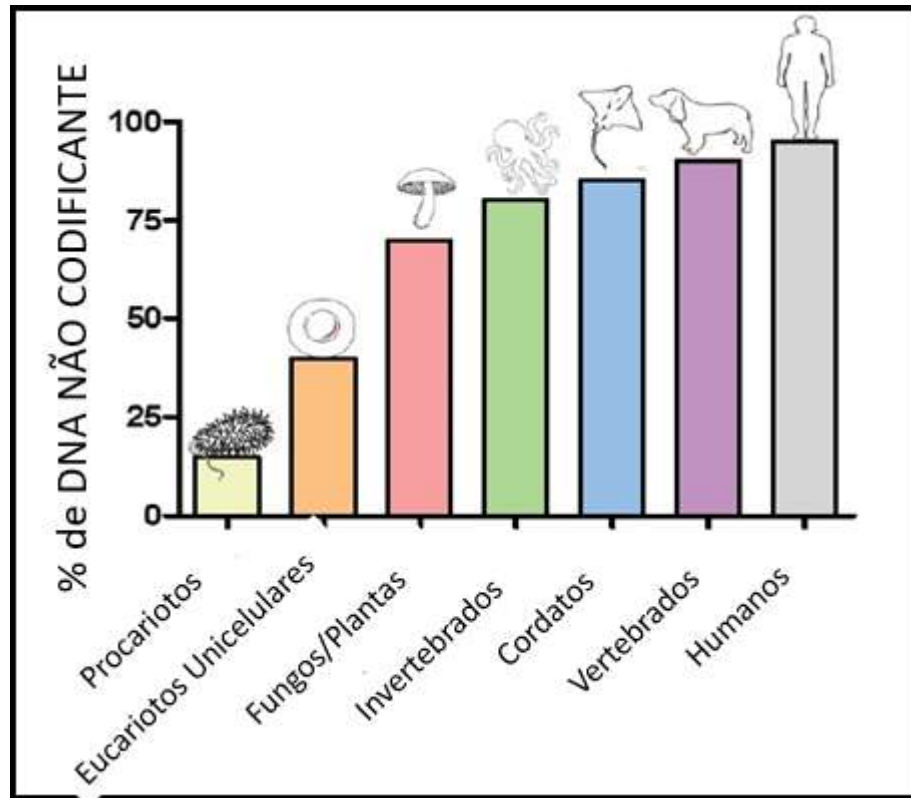


FIGURA 3: COMPLEXIDADE GENÉTICA DOS ORGANISMOS COMPARADOS PELO CONTEÚDO DE ncRNA. Entre os eucariotos, à medida que a complexidade do organismo aumenta, aumenta também a proporção de DNA não codificante. FONTE: Adaptado de BALLANTYNE, 2017.

Essas descobertas têm chamado a atenção para a importância biológica dessa classe de moléculas e mostrando que mesmo com ausência de codificação de proteínas, os ncRNAs apresentam um papel significativo em uma série de processos biológicos em diversas formas de vida (YOON *et al.*, 2013), tais como a compensação de dosagem (LI *et al.*, 2016), *imprinting* genômico (GABORY *et al.*, 2010), manutenção da integridade do genoma (NOBILI *et al.*, 2016), controle do ciclo celular (TRIPATHI *et al.*, 2013), desenvolvimento (ULITSKY *et al.*, 2016) e diferenciação (JIA *et al.*, 2016).

Classicamente, para efeito de sistematização, esses ncRNAs têm sido classificados em função do seu tamanho. Eles podem ser classificados em moléculas menores de que 200 nucleotídeos como os RNAs transportadores (tRNA), os RNAs ribossômicos (rRNA), os RNAs de spliceossomo (snRNA), os pequenos RNAs de nucléolo (snoRNA), os microRNAs (miRNAs), os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e os *piwi-interacting* RNAs (piRNA). Aquelas moléculas maiores do que 200 nucleotídeos sem função estrutural são chamados longos RNAs não codificantes (lncRNAs) (MATTICK & MAKUNIN, 2006; CLARK & MATTICK,

2011), existem muitas dúvidas no que diz respeito a essa classe de moléculas e ainda não existe um consenso quanto a sua classificação. Novas variedades de ncRNAs ainda estão sendo descobertas e os pesquisadores utilizam diferentes características para classificá-las.

2.6 RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES

Os lncRNAs representam uma família heterogênea de RNAs, com tamanhos maiores que 200 nucleotídeos de comprimento (KHALIL *et al.*, 2009). São transcritos de modo muito similar aos RNAs que codificam proteínas, a maior parte sendo transcritos pela RNA polimerase II (Pol II), processados, poliadenilados e com adição de *cap-5'*. É comum observar uma sequência promotora proximal altamente conservada, éxons, íntrons e sequências características de estruturas secundárias na maioria dos lncRNAs (NIE *et al.*, 2012). Estes transcritos divergem de outras classes de ncRNAs conhecidos não somente pelo seu tamanho, mas também devido a sua enorme diversidade no que diz respeito à conservação evolutiva, o nível de expressão, função e localização celular (ULITSKY & BARTEL, 2013).

Por muito tempo esses lncRNAs foram considerados como lixo ou produtos secundários derivados do processo de transcrição, devido à sua vasta abundância (COMINGS, 1972). No entanto, atualmente se sabe que os lncRNAs apresentam um papel importante na regulação da expressão gênica tanto nos níveis transcricionais quanto pós-transcricionais em diversos contextos celulares, participam de um amplo conjunto de processos biológicos, tais como o desenvolvimento de células T (HU *et al.*, 2013), a pluripotência (GUTTMAN *et al.*, 2011), o comprimento do telômero (AZZALIN *et al.*, 2007), a invasividade e metástase (BELTRAN *et al.*, 2008) e a resposta ao dano do DNA (WAN *et al.*, 2013).

Os lncRNAs são uma classe grande e diversificada, que tem se mostrado extremamente versátil, atuando na regulação da expressão gênica por uma variedade de mecanismos (SOMAROWTHU *et al.*, 2015). A alta diversidade de lncRNAs torna quase impossível uma classificação única para essas moléculas. Diante disso, a solução encontrada foi classificá-los de acordo com diferentes critérios, como o tamanho do transcrito, a associação ou semelhança com genes

codificadores de proteínas e a expressão em diferentes estágios biológicos (St. LAURENT *et al.*, 2015). Tendo em vista a dificuldade de se estudar as funções dos lncRNAs, outro critério genérico utilizado para classificar essa classe é a sua localização genômica (BAKER, 2011).

Como as informações são limitadas sobre função e mecanismo de ação dos lncRNAs, uma maneira de organizar e classificar os transcritos é com base na sua posição em relação aos genes codificadores de proteína. A plataforma GENCODE organiza e classifica os transcritos com base na sua localização e também em relação a genes codificadores de proteínas, a partir dela os lncRNAs podem ser agrupados em 5 classes: RNAs antisenso, RNAs intrônicos, longos RNAs intergênicos, transcritos senso sobrepostos, e transcritos sem ORFs (DERRIEN *et al.*, 2012). Os lncRNAs antisenso são transcritos através do éxon de genes codificadores de proteínas na fita oposta (MÜLLER *et al.*, 2014), enquanto que os lncRNAs intrônicos são transcritos a partir de regiões intrônicas com sentido ou orientação anti-sentido. O maior grupo dentro todos, são os lncRNAs intergênicos (lincRNAs), que estão localizados entre genes que codificam proteínas (GUTTMAN *et al.*, 2009; CABILI *et al.*, 2011). Os transcritos senso sobrepostos são definidos por conterem um gene codificador dentro de sua sequência intrônica na mesma fita e finalmente, os transcritos que não podem ser alocados em nenhuma das outras categorias por não apresentarem nenhuma janela aberta de leitura (*ORF*) (DERRIEN *et al.*, 2012) (FIGURA 4).

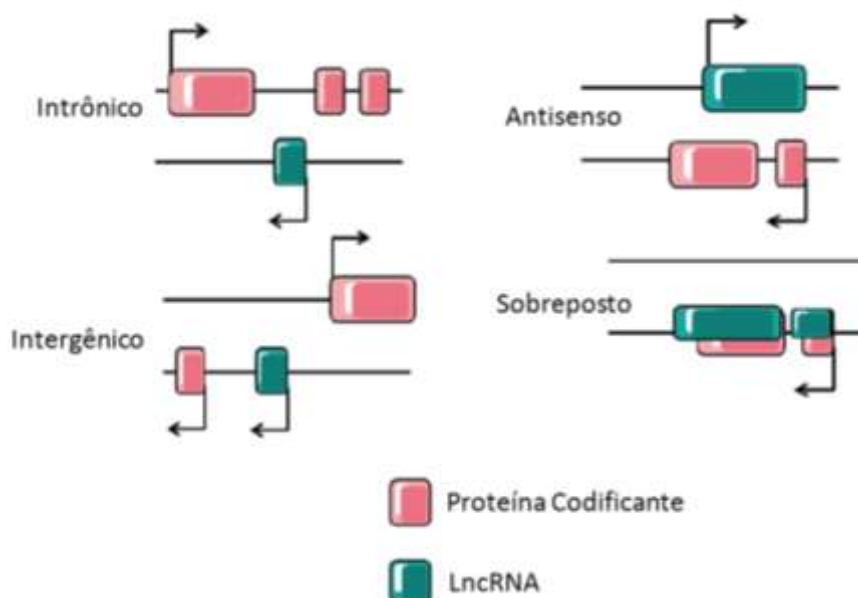


FIGURA 4: CLASSIFICAÇÃO DOS lncRNAs COM BASE EM SUA POSIÇÃO NO GENOMA. LncRNAs em relação a genes codificadores de proteínas. FONTE: Adaptado de BALLANTYNE, 2017.

Os lncRNAs podem agir diretamente na transcrição ou podem atuar como moléculas de sinal em situações de estresse ou outros estímulos, sendo capazes de apresentar uma alta especificidade de expressão tecidual correspondente (MALIH *et al.*, 2015). Os lncRNAs podem funcionar como iscas para atrair moléculas de fatores de transcrição, modificadores de cromatina ou outros fatores regulatórios a sítios específicos do genoma, ou também como guias para o ancoramento de proteínas regulatórias, direcionando-as para alvos específicos (ARD *et al.*, 2013; HAN & CHANG 2015). Além disso, os lncRNAs podem servir como plataformas, onde ligam-se a diversas unidades de outras moléculas reguladoras, como proteínas e microRNAs, funcionando assim como esponjas, e consequentemente afetando a expressão de seus alvos (WANG & CHANG, 2011; KALLEN *et al.*, 2013) (FIGURA 5).

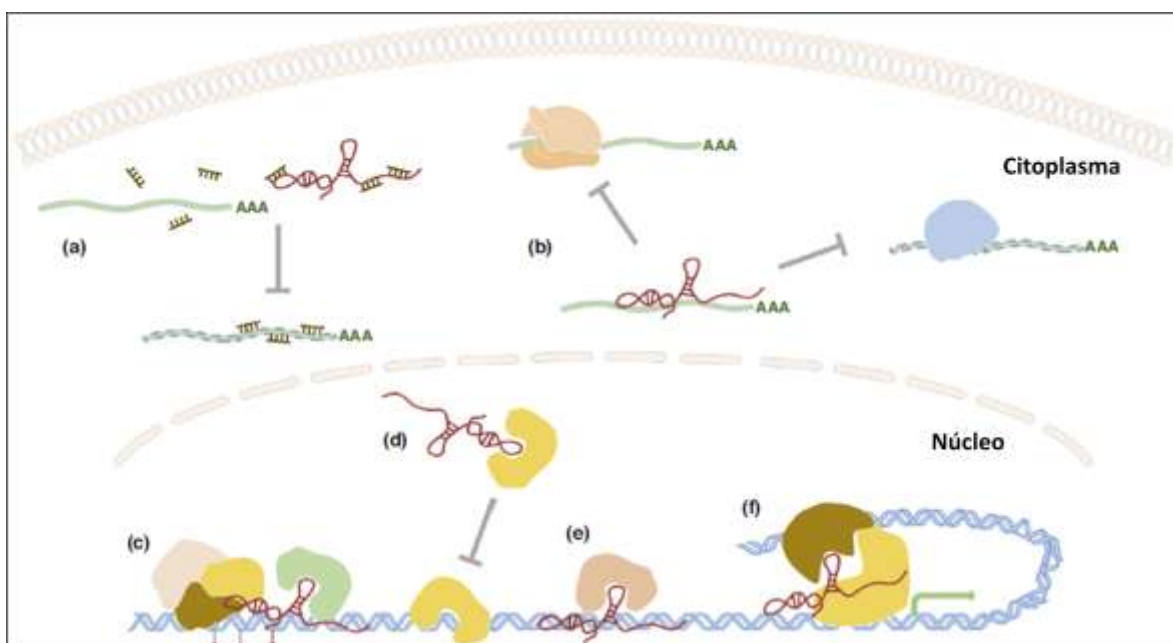


FIGURA 5: OS PRINCIPAIS MECANISMOS MOLECULARES DOS lncRNAs NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA. **(a)** lncRNA atuando como competidores endógenos. **(b)** lncRNA ligando-se a mRNA, reprimindo a tradução e a degradação do mRNA alvo. **(c)** lncRNA servindo como plataforma, por exemplo, recrutando complexo de modificação de cromatina. **(d)** O lncRNA atuando como chamariz, ligando-se a proteínas e levando-as para longe da cromatina. **(e)** lncRNA atuando como guia para proteínas, direcionando-as para alvos específicos para regular sua expressão. **(f)** lncRNA recrutando os fatores de transcrição para a região promotora. FONTE: Adaptado de HU, 2017.

Com o avanço dos estudos, está ficando mais evidente que os lncRNAs mostram uma expressão específica ao tipo da célula em resposta a diversos estímulos e sua função está associada a sua localização subcelular. No entanto, os mecanismos por trás da localização específica dentro das células para desempenhar papel na regulação de genes, permanecem em grande parte desconhecidos. (CHEN, 2016). Alguns exemplos de lncRNAs já descritos, apresentam estruturas secundárias altamente estáveis, que podem estar diretamente relacionadas com a sua função celular (KASSUBE *et al.*, 2012).

Considerando a arquitetura gênica complexa e a gama de funções que os lncRNAs desempenham, não é surpreendente que eles tenham sido implicados em doenças humanas (FATICA & BOZZONI, 2014; LI & CHANG, 2014). Dentre todas as características dos lncRNAs, algumas tem sido relevantes para o estudo de doenças complexas, eles geralmente apresentam expressão específica em relação a um tecido, estágio do desenvolvimento e também em condições patológicas particulares.

Além disso, tal como acontece com a desregulação em miRNAs, a desregulação em lncRNAs está se tornando cada vez mais reconhecida como característica distinta em muitos tipo de doenças (SHI *et al.*, 2013). O reconhecimento do papel dos lncRNAs em doenças humanas tem revelado novas oportunidades do uso dessas moléculas como potenciais alvos terapêuticos (GUSTSCHNER & DIEDERICHS, 2012; BRUNNER *et al.*, 2012).

Apesar da recente explosão de conhecimentos ter demonstrando a importância e diversidade de funções dessa classe de moléculas em mecanismos de regulação gênica, grande parte das dezenas de milhares de lncRNAs presentes no genoma humano, permanecem ainda desconhecidos (IYER *et al.*, 2015; ULITSKY & BARTEL, 2013). Estudos detalhados acerca das funções e atividades moleculares, são necessário para elucidar melhor o papel biológico desses lncRNAs.

2.7 lncRNAs NO CÂNCER

Estudos de transcriptoma detectaram uma série de lncRNAs desregulados em tecidos de câncer ou em linhagens celulares (RINN *et al.*, 2007; MATOUK *et al.*,

2009; WANG *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2011). Por muitos anos, já havia suspeitas sobre o papel da expressão diferencial de lncRNAs no câncer, no entanto faltavam evidências que pudessem suportar essa relação (RAINIER *et al.*, 1993). Alguns trabalhos demonstraram que lncRNAs estão associados a inúmeros processos, por exemplo, regulação da transcrição, *splicing* alternativo, regulação epigenética (metilação do DNA, remodelação de cromatina, modificação de histonas e silenciamento de genes). Além disso, os lncRNAs também podem funcionar como inibidores competitivos de microRNAs, atuando como esponjas para diminuir seus níveis de expressão (TAFT *et al.*, 2009; 2010; JURACEK *et al.*, 2014).

Similarmente aos genes codificadores de proteínas, os lncRNAs podem atuar ativamente em todas as etapas da carcinogênese, funcionando assim como oncogenes ou supressores de tumor (MALIH *et al.*, 2015). Os recentes avanços na exploração dos mecanismos reguladores apresentados pelos lncRNAs revelam que estes participam na promoção da tumorigênese através de uma rede complexa construída em sinergia com diversas outras biomoléculas (YUWEI *et al.*, 2017), tais como outros ncRNAs, DNA e proteínas, ampliando sua parcela de contribuição no que diz respeito a malignização celular.

A expressão diferencial de lncRNAs no câncer, somada a sua especificidade tecidual, versátil rede de regulação e a grande variabilidade, fornecem a esses lncRNAs um potencial como marcadores para diagnóstico e prognóstico. Um exemplo de um lncRNA que já foi utilizado na prática clínica para diagnóstico de câncer de próstata é o PCA3. Ele é altamente expresso em tecidos de câncer de próstata e também está presente na urina ou sedimentos de urina após massagem prostática ou exame retal digital. A fácil obtenção do material para análise e a alta especificidade de PCA3 resultaram na redução de biópsias de próstata desnecessárias (MARKS *et al.*, 2007; TINZL *et al.*, 2004; HESSELS *et al.*, 2003; Van GILS *et al.*, 2007).

Além do uso como marcadores de diagnóstico, os lncRNAs estão sendo alvo de terapia contra o câncer. Um grupo de lncRNAs foi relatado como sendo relacionado a respostas a drogas e resistência (ADRIAENS *et al.*, 2016). ZHU e colaboradores (2011) mostraram que o silenciamento de lncRNAs recém-identificados, melhoram a sensibilidade à quimioterapia em linhagens celulares.

Os lncRNAs demonstraram estar envolvidos tanto no desenvolvimento da glândula mamária como na evolução do câncer de mama (HANSJI *et al.*, 2014). Alguns lncRNAs identificados já foram comprovadamente associados com alterações funcionais apresentadas pelos tumores de mama, como por exemplo o H19, HOTAIR, MALAT1, LINCT5, ZRAS1 e UCA1 (VIKRAM *et al.*, 2014).

O câncer de mama é uma neoplasia bastante heterogênea e possui variações moleculares tanto entre subtipos tumorais quanto dentro de um mesmo tumor. Partindo disso, SU e colaboradores (2014) coletaram informações de dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq) de 658 amostras de tumor mamário disponíveis no banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), e traçaram um perfil de expressão de lncRNAs que poderiam ser relevantes no desenvolvimento do câncer de mama. Os resultados obtidos a partir do padrão de expressão dos lncRNAs, permitiram identificar a ocorrência de quatro subgrupos molecularmente distintos de câncer de mama: grupo I, relacionado ao subtipo basal; grupo II, correspondente ao subtipo HER2; grupo III relacionado ao subtipo luminal A; e grupo IV, que engloba o subtipo luminal B. Esses resultados demonstram que o câncer de mama pode ser caracterizado molecularmente, também a partir da avaliação do perfil de expressão dos lncRNAs (SU *et al.*, 2014).

Tumores de mama histologicamente semelhantes, com os mesmos estádios e graus de diferenciação podem apresentar distintos desfechos em relação os fatores prognósticos, tornando difícil de prever as respostas aos tratamentos instituídos (KOBOLDT *et al.*, 2012). Essa complexidade se mostra como um obstáculo que deve ser superado a fim de melhorar a classificação e terapia. O estudo dos lncRNAs no câncer apresentam grande relevância, é fundamental encontrar biomarcadores não invasivos que apresentem alta sensibilidade e especificidade, que possam vir a ser utilizados como marcadores para detecção do câncer de mama em estágios iniciais e também no monitoramento da resposta a terapia (MENG *et al.*, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença heterogênea com variações moleculares significativas, tanto entre subtipos tumorais quanto em um único tumor. Com base nessas informações, no crescente volume de trabalhos nessa área que permitiram que um conjunto de informação fossem integradas em banco de dados e nas dificuldades encontradas no diagnóstico precoce e tratamento da doença, vamos avaliar como se dá a expressão de lncRNAs selecionados, que estão possivelmente envolvidos com o câncer de mama, em linhagens tumorais de mama que corresponde aos diferentes subtipos tumorais. Com o objetivo de identificar novas moléculas que possam ser exploradas como biomarcadores promissores para o diagnóstico, prognóstico e, posteriormente, apresentar possíveis alvos terapêuticos.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral:

- Avaliar o nível de expressão de lncRNAs em diferentes linhagens de câncer de mama.

4.2. Objetivos específicos:

- Cultivar linhagens tumorais de mama;
- Extrair RNA e produzir cDNA destas linhagens;
- Selecionar lncRNAs com possível envolvimento no câncer de mama;
- Testar a eficiência de primers para os lncRNAs escolhidos;
- Analisar expressão dos lncRNAs nas linhagens cultivadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cultivo celular

As linhagens de carcinoma de mama MCF-7, BT474, SKBR3, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e a linhagem normal denominada 184B5 foram obtidas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) da Universidade

Federal do Paraná. No QUADRO 4 pode ser observada a classificação imunohistoquímica das linhagens segundo o status de RE (receptor de estrogênio), RP (receptor de progesterona) e HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2) de acordo com DAI e colaboradores (2017).

QUADRO 4. CLASSIFICAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS LINHAGENS UTILIZADAS.

Linhagens	ER	PR	HER2	Classificação
MCF7	+	+	-	Luminal A
BT474	+	+	+	Luminal B
SKBR3	-	-	+	HER2
MDA-MB-231	-	-	-	Triplo Negativo
MDA-MB-436	-	-	-	Triplo Negativo
MDA-MB-468	-	-	-	Triplo Negativo

ER (receptor de estrogênio), PR (receptor de progesterona) e HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2). FONTE: Adaptado de DAI *et al.*, 2017.

As linhagens BT474, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (pH 7.2-7.4), 1% de L-glutamina e 1% de solução de antibióticos (penicilina G sódica 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, Sigma-Aldrich). A linhagem SKBR3 foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (pH 7.2-7.4), 1% de L-glutamina e 1% de Penicilina/estreptomicina e a linhagem 184B5 foi cultivada em meio MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium, LONZA) enriquecido com suplementos (Insulina, GA-1000, BPE, rhEGF, hidrocortisona). Todas as culturas foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

O crescimento foi acompanhado diariamente e as células foram repicadas quando atingiram 80-90% de confluência. O meio de cultivo foi retirado das garrafas, as células foram lavadas com Tampão fosfato-salino 1X (PBS) aquecido previamente, seguida por incubação com uma solução de 0,25% Tripisina-EDTA durante 3 minutos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram ressuspensas em seus meios correspondentes e acondicionadas em novas garrafas para dar continuidade ao cultivo até a obtenção do número necessário de células para extração de RNA (1x10⁶ células).

5.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita utilizando o kit RNA Mini PureLink (Ambion), seguindo as instruções do fabricante para células animais. As células foram lisadas com 600µl de tampão de lise com 1% de β -mercaptoetanol, o mesmo volume de etanol 70% foi adicionado, o lisado foi centrifugado em coluna do kit por 15 segundos à 12000 x g em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e a coluna lavada com 700µl do tampão de lavagem I, centrifugado por 15 segundos à 12000 x g em temperatura ambiente. A coluna foi lavada por mais 2 vezes com 500µl de tampão de lavagem II (preparado previamente com Etanol de acordo com as especificações do fabricante), centrifugado por 15 segundos à 12000 x g em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado, um novo tubo de coleta foi inserido e então centrifugado por 1-2 minutos à 12000 x g. Em um tubo de coleta livre de RNase, o RNA foi eluído da coluna com adição de 30µl de água (livre de RNase), por centrifugação, por 2 minutos à 12000 x g.

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop Spectrophotometer 2000, Thermo Scientific, Wilmington, USA), que indica os padrões de pureza e contaminação do material de acordo com os parâmetros de absorbância. Os RNAs absorvem comprimentos de onda por volta de 260nm enquanto que proteínas em torno de 280nm, e outros componentes orgânicos absorvem em torno de 230nm, dessa forma, a relação Abs260nm/Abs280nm indica contaminação com proteínas e a relação Abs260nm/Abs230nm indica a contaminação com outros componentes orgânicos. O produto final foi estocado à -80°C.

5.3 Síntese de cDNA

A fim de garantir que a amostra estivesse livre de qualquer contaminante de DNA genômico, previamente à síntese de cDNA, foi realizado um tratamento com DNase (INVITROGEN) por 30 minutos, segundo orientação do fabricante.

Partindo de uma concentração inicial de 1,0µg de RNA total, foram sintetizadas fitas simples de cDNA através da transcrição reversa por meio da enzima Super Script III (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações

do fabricante. Uma mistura de RNA, 1µl de dNTP 10mM e 1µl de *Random Hexomers* (oligonucleotídeos de sequência aleatória de seis nucleotídeos), foi preparada em um volume final de 14,5µl e incubado a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, 4µl de *First-Strand Buffer 5x*, 1µl de DTT 0.1M (Ditioneitol) e 0,5µl de SuperScript III RT foram adicionados. A reação foi incubada 25°C por 5 minutos, a 50°C por 1 hora e a 70°C por 15 minutos. Uma reação -RT foi feita substituindo a transcriptase reversa por água, para controle da reação por qualquer contaminação residual de DNA genômico, uma vez que a presença do mesmo poderia servir como DNA molde na qRT-PCR, interferindo na análise dos dados de expressão. As amostras de cDNA foram estocadas a -20°C.

5.4 Seleção de lncRNAs

Partindo de uma análise global da expressão de lncRNAs em câncer de mama, um projeto realizado pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da UFPR, três lncRNAs foram selecionados para avaliar a expressão em diferentes linhagens tumorais de câncer de mama. Dois deles (NORAD e NEAT1_1) já foram descritos na literatura por estarem envolvidos em vias importantes do câncer, o terceiro (AC008771.1), ainda sem trabalhos descritos, foi selecionado por apresentar expressão diferencial entre pacientes com diferentes subtipos de câncer de mama. Estes dados de expressão foram obtidos por meio do banco de dados TANRIC (do inglês *The Atlas of non-coding RNA in Cancer*) versão 1.0.6, um recurso de acesso aberto para a exploração interativa de ncRNAs em câncer. O TANRIC é uma ferramenta que caracteriza os perfis de expressão de lncRNA em grandes coortes de pacientes de 20 tipos de câncer, inclui um conjunto de dados do TCGA (do inglês *The Cancer Genome Atlas*), do CCLE (do inglês *Cancer Cell Line Encyclopedia*) e outros conjuntos de dados independentes.

O TANRIC permite analisar de forma rápida e intuitiva os lncRNAs de interesse, tanto os lncRNAs anotados quanto aqueles definidos pelo usuário, no contexto de dados clínicos e outros dados moleculares, tanto dentro como entre os tipos de tumores. TANRIC representa uma ferramenta valiosa para estudos de

função e a relevância clínica dos lncRNAs em câncer, facilitando grandemente as descobertas biológicas relacionadas ao lncRNAs e as aplicações clínicas.

5.5 Eficiência dos oligonucleotídeos (*primers*)

Com o objetivo de avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada lncRNA-alvo e a concentração ideal de cDNA para ser utilizada nos ensaios de expressão, foi realizada uma curva de diluição de cDNA partindo de uma concentração inicial do cDNA: 50ng; 25ng; 12,5ng; 6,25ng e 3,12ng (considerando 100% de eficiência da reação de transcrição reversa), derivadas de um *pool* das linhagens celulares utilizadas neste trabalho. Os *primers* foram diluídos a 10 μ M, concentração comumente utilizada na rotina de trabalho do laboratório, as reações foram submetidas à amplificação pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) em equipamento Viia-7 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem) sob as mesmas condições.

Após a amplificação, foi gerada uma curva de regressão linear a partir dos valores de número de ciclos (Ct) e das diferentes concentrações de cDNA. Foi gerado um cálculo de correlação entre as variáveis (R^2) e a eficiência do par de *primers* foi calculada utilizando a inclinação da reta (*slope*) da curva padrão por meio da fórmula:

$$[\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1]$$

5.6 Quantificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão gênica foi realizada a partir da técnica de PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR) em equipamento Viia-7 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem) em placa de 96 poços.

Para a quantificação do produto formado durante a reação de amplificação, será utilizado o reagente SYBR®GreenDye (Applied Biosystems). Este reagente possui intensidade de emissão de fluorescência significativamente aumentada quando ligado à dupla fita de DNA. Assim, quando ligado ao DNA, emite

fluorescência no comprimento de onda de 520nm, permitindo a detecção do produto da reação de PCR em tempo real.

Todas as reações foram realizadas em triplicatas em um volume final de 10µl. Como molde, foram utilizados 4,5µl do cDNA sintetizado e diluído 1:20 e 1:10 em água Milli-Q®. Para cada reação, 0,5µl do conjunto de primers na concentração final de 1:10 e 5µl do reagente SYBR®GreenDye foram usados.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 10 min (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 min (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do *amplicon*). Para avaliar a especificidade das reações de amplificação e detectar a presença de eventual contaminação, uma reação de dissociação do produto amplificado foi realizada ao término de cada reação. Além disso, foram realizadas reações controles de amplificação na ausência de molde (cDNA) denominadas NTC (Non-template Control), além de controles usando amostras provenientes da reação de transcrição reversa na ausência da enzima (-RT).

Considerando a possibilidade de variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de diferentes linhagens, foi realizada a normalização da expressão, na qual a expressão do lncRNA-alvo foi determinada em função da expressão de genes controles. Assim, a quantificação das amostras foi realizada utilizando-se como controle os *primers* para GUS β e β -ACTINA, genes de expressão constitutiva usados como controle positivo da reação de amplificação. A média dos níveis de expressão de GUS β e β -ACTINA foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do lncRNA-alvo para todas as linhagens e o método de análise usado foi o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ (QUADRO 2).

QUADRO 5. SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
NORAD	5'TGTATGTCAGGACTTGTTTCATTAGGTT3' 5'TGATAGGATACATCTTGGACATGGA3'	75pb
ACTINA β	5'CCGATCCACACGGAGTACTTG3' 5'GGCACCCAGCACAATGAAG3'	150pb
GUS β	5'CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA3' 5'GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT3'	101pb
NEAT 1_1	5'TTTGTGCTTGGAACCTTGCT3' 5'TCAACGCCCAAGTTATTTTC3'	199pb
AC008771.1	5' GAAGCTGGTGGTAGCTCTGAA 3' 5' CACGCCTCACACTTCAACAT3'	136pb

FONTE: O autor (2017).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Validação dos *primers*

Para o presente trabalho, foi verificada a eficiência de dois dos *primers* utilizados (NEAT1_1 e AC008771.1), já que os outros três *primers* (GUS β , ACTINA β e NORAD) já possuíam cálculos de eficiência decorrentes de trabalhos anteriores do LabCHO.

Foi gerada uma curva de regressão linear a partir dos valores de Ct e das diluições de cDNA provenientes do *pool* de linhagens. Foi utilizado o *pool* de linhagens com o objetivo de identificar a expressão dos genes alvos nas amostras, independente da linhagem. A análise da eficiência foi feita utilizando a inclinação da reta (*slope*) da curva padrão e foi calculada pela fórmula [Eficiência = $10^{(-1/slope)} - 1$]. Os valores de eficiência que indicam boa reação devem estar entre 90 e 110%. Foi possível observar que para ambos os *primers* que foram avaliados, a eficiência encontrada estava dentro dos limites aceitáveis para uma boa reação. Foi gerado também o coeficiente de correlação (R^2) que representa o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais dos Ct de amostras, onde valores próximos a 1 indicam um ajuste perfeito. Para exemplificar como é observada a curva de regressão, utilizamos o resultado obtido do par de *primers* para o lncRNA AC008771.1 que pode ver visualizado no GRÁFICO 1.

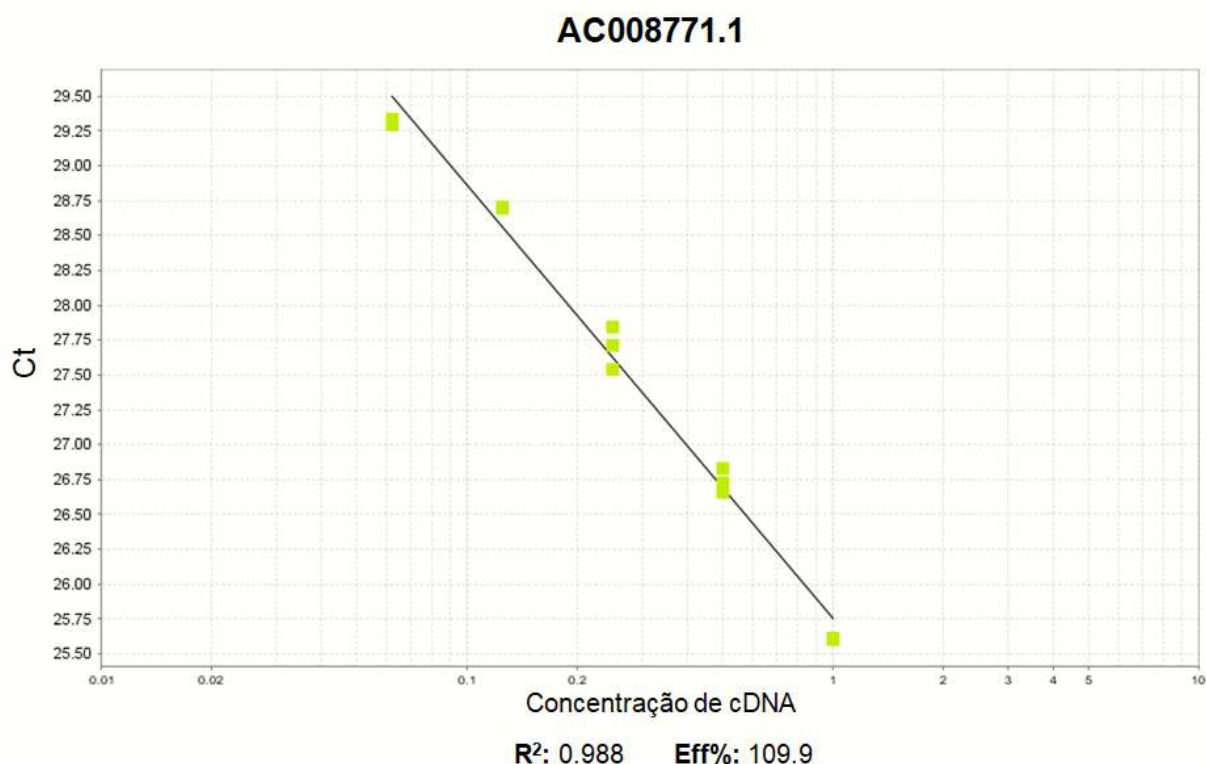


GRÁFICO 1. CURVA DE REGRESSAO LINEAR DO lncRNA AC008771.1. Curva regressão linear a partir dos valores de Ct (número de ciclos) e da concentração de cDNA (valores expressos em ordem de diluição). FONTE: O autor (2017).

Os resultados obtidos mostraram que os *primers* NEAT1_1 e AC008771.1 apresentaram amplificação e valor de eficiência dentro dos limites esperados, demonstrando que esses *primers* são capazes de dobrar o número de produto gerado durante a PCR com o passar dos ciclos de forma eficiente, ao passo que a quantidade de cDNA diminui pela metade a cada ciclo. Dessa forma, foi dada continuidade ao trabalho para avaliar a expressão desses lncRNAs em cada linhagem tumoral individualmente.

6.2 Análise de expressão

O presente trabalho buscou analisar a expressão de 3 lncRNAs que apresentam possível envolvimento em vias importantes do câncer, em diferentes linhagens tumorais de mama. O uso de linhagens celulares de câncer de mama tem se mostrado bem atraente como modelo de pesquisa. As linhagens celulares quando estabelecidas são facilmente propagadas, fornecendo maiores condições para a manipulação genética, além disso, em condições experimentais estáveis e

bem definidas, tendem a produzir resultados confiáveis e que podem ser reproduzidos.

O NORAD, um dos lncRNA avaliados, é abundante em células humanas e bem conservado evolutivamente, sua expressão é aumentada em resposta a danos ao DNA e parece estar relacionado a mecanismos de regulação gênica (TICHON *et al.*, 2016). Os resultados de expressão mostraram que a linhagem SKBR3 apresentou expressão muito semelhante à da linhagem normal. No entanto, as demais linhagens apresentaram níveis menores de expressão, especialmente MDA-MB-231 e MDA-MB-436 que apresentaram níveis de expressão bem semelhantes e quase sete vezes menores do que a expressão normal (GRÁFICO 2).

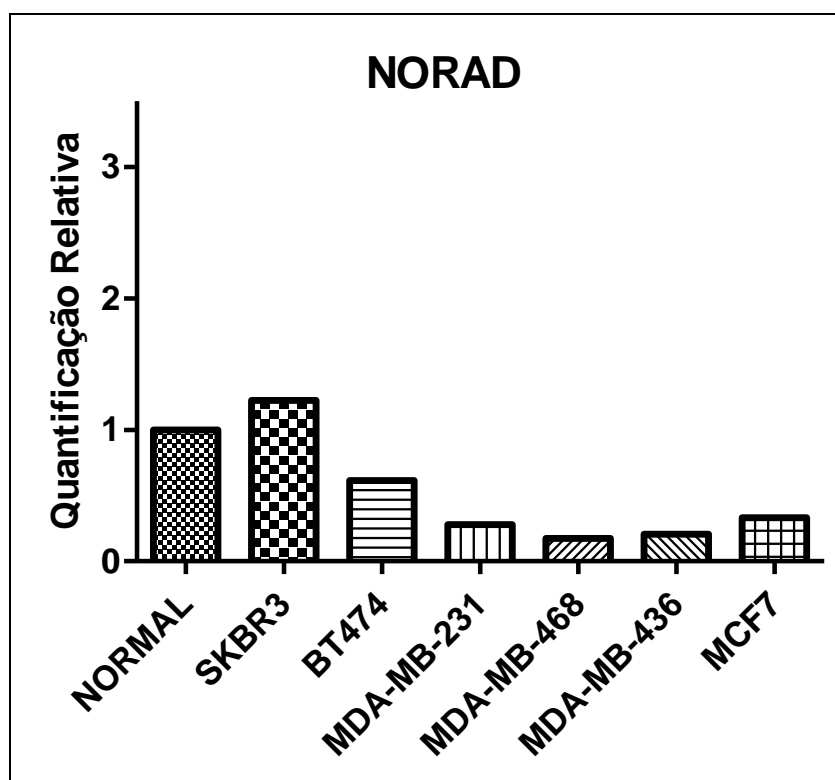


GRÁFICO 2. GRÁFICO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE EXPRESSÃO DE NORAD EM DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. FONTE: O autor (2017).

Essas duas linhagens, segundo o padrão de imunomarcagem, estão inseridas no grupo denominado de Triplo-Negativo, que engloba um grupo heterogêneo de tumores mamários que apresentam perda de expressão dos receptores hormonais (RE e RP) e da superexpressão de HER2. Os tumores triplo-negativos têm um pior prognóstico, apresenta maior recorrência no período de três anos e maiores taxas de mortalidade em cinco anos, quando comparado com outros

subtipos (BAUER *et al.*, 2007; CAREY *et al.*, 2007). A linhagem MDA-MB-468, também pertence ao subtipo tumoral triplo-negativo e chamou atenção por apresentar nível de expressão quase nove vezes inferior do que a linhagem normal.

Os resultados apresentam relação com a função já descrita para NORAD. Trabalhos recentes vêm demonstrando que o NORAD pode estar envolvido com a preservação da estabilidade genômica por meio da regulação negativa da função das proteínas PUMILIO, proteínas que atuam na inibição da tradução de mRNAs alvos no citoplasma. NORAD apresenta capacidade de sequestrar uma fração significativa do total de PUM1 e PUM2 presentes no citoplasma, funcionando com uma plataforma de ligação para as proteínas PUM. A ligação de NORAD com essas proteínas pode ocorrer através de pelo menos 15 sítios de ligação funcionais, essa ligação suprime a degradação dos mRNAs alvo por competição ao sítio de ligação. A atuação de NORAD pode, dessa forma, modular a abundância de mRNAs alvos de PUMILIO, em particular aqueles que estão envolvidos com a progressão mitótica (TICHON *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016).

A expressão aumentada de NORAD em resposta ao dano ao DNA resulta no sequestro das proteínas PUMILIO, deixando-as indisponíveis para reprimir a tradução de seus alvos, que passam então a serem traduzidos. A tradução desses mRNAs promovem a integridade do genoma por estarem relacionadas com o reparo do DNA, com regulação do ciclo celular e com a segregação cromossômica gerando uma resposta rápida ao dano (LEE *et al.*, 2016).

Na ausência de expressão de NORAD, as proteínas PUMILIO apresentam ampla disponibilidade, reprimem excessivamente a tradução dos mRNAs alvo, resultando em instabilidade cromossômica, como poliploidias e alterações cromossômicas estruturais. A superatividade de PUMILIO, em ausência da modulação de NORAD, parece estar relacionada ao surgimento de aneuploidias em células cariotipicamente normais, corroborando a ideia de que a inativação de NORAD em linhagens de células humanas normais resulta em instabilidade cromossômica (LEE *et al.*, 2016). Os resultados obtidos mostraram que o lncRNA NORAD é pouco expresso na maioria das linhagens tumorais, com exceção da linhagem SKBR3, indicando um potencial para uso como biomarcador no câncer de mama.

Outro lncRNA que vem sendo estudado e caracterizado, é produto do gene *NEAT 1* (do inglês *Nuclear Enriched Abundant Transcript 1*). Este gene gera duas variantes transcricionais de lncRNAs, nomeados de *NEAT1_1* (3,7 kb de comprimento) e *NEAT1_2* (23kb de comprimento). Essas duas variantes estão localizadas e desempenham papel central em *paraspeckles* nucleares (NAGANUMA & HIROSE, 2013), também compartilham o mesmo promotor, mas apresentam diferentes vias de processamento em sua região 3' (ZHANG *et al.*, 2013). Os *paraspeckles* são pequenos corpos subnucleares de aproximadamente 0,5-1 µm de diâmetro, que apresentam forma irregular e ocorrem no espaço intercromatínico (CARDINALE *et al.*, 2007). Embora a função exata desses *paraspeckles* nucleares ainda não esteja totalmente clara, eles foram relacionados com o desenvolvimento do corpo lúteo e da glândula mamária bem como a diferenciação mielóide (CHEN *et al.*, 2009; STANDAERT *et al.*, 2014).

Desde a sua descoberta, *NEAT1* tem sido amplamente investigado em várias malignidades humanas, já se sabe que ele é super expresso em linhagens celulares de câncer e em tecidos como no câncer de próstata, pulmão e mama (YOU *et al.*, 2014; CHAKRAVARTY *et al.*, 2014; CHOUDHRY *et al.*, 2015). Na maioria dos tipos de tumor sólido, *NEAT1* é regulado positivamente e desempenha um papel oncogênico em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (YU *et al.*, 2016). Alguns trabalhos mostraram que a sobre-expressão de *NEAT1* poderia influenciar a apoptose celular e migração (XIANGUO *et al.*, 2016; KE *et al.*, 2016), dessa forma, o nível de expressão desse lncRNA pode ser um indicador de características intrínsecas da progressão do câncer por estar envolvido na regulação de importantes processos como a proliferação celular, ciclo celular e apoptose.

CHOUDHRY e colaboradores (2015) demonstraram que *NEAT1* estava entre um dos lncRNAs induzidos pela hipóxia em células de câncer de mama. O aumento de sua expressão em hipóxia promoveu a proliferação celular e sobrevivência clonogênica, bem como a diminuição da apoptose. Dessa forma, *NEAT1* mostrou desempenhar um papel na sobrevivência celular no câncer de mama relacionada à hipóxia. Além disso, recentemente foi relatado que esse lncRNA também está envolvido na resposta ao estresse de replicação desencadeado por

p53 e quimiossensibilidade (ADRIAENS *et al.*, 2016), sugerindo que NEAT1 desempenha funções oncogênicas e respostas tumorais à quimioterapia.

O mecanismo pelo qual NEAT1 medeia suas ações é complexo e envolve múltiplos fatores (YU *et al.*, 2016), mas muitos trabalhos já têm mostrado que a expressão elevada de NEAT1 está significativamente associada com tempo de sobrevida mais curta em pacientes com câncer, inclusive o câncer de mama (YANG *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2017).

No presente trabalho, foi avaliada a expressão apenas de uma das variantes de NEAT1, o NEAT1_1. Foi observado que com exceção da linhagem MCF-7, todas as linhagens apresentaram baixa expressão de NEAT1_1 (GRÁFICO 3). ZHANG e colaboradores (2017) avaliaram a expressão de NEAT1 em algumas linhagens de câncer de mama, três das linhagens utilizadas por eles também foram utilizadas no presente trabalho (MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MCF7), entretanto, eles observaram que para todas as linhagens avaliadas o lncRNA NEAT1 estava super expresso, quando comparado com a linhagem normal utilizada por eles, neste caso a linhagem MCF-10A.

Um dos fatores que pode refletir nesta diferença observada entre a expressão de NEAT1 nas diferentes linhagens entre os dois trabalhos é o uso de diferentes linhagens normais para nível de comparação. Como já citado, no trabalho desenvolvido por ZHANG e colaboradores, a linhagem normal utilizada foi a MCF-10A, enquanto que no presente trabalho foi utilizada a linhagem 184B5. Mesmo que ambas as linhagens sejam consideradas normais, elas exibem diferenças entre a expressão de alguns genes (CHARAFE-JAUFFRET *et al.*, 2006).

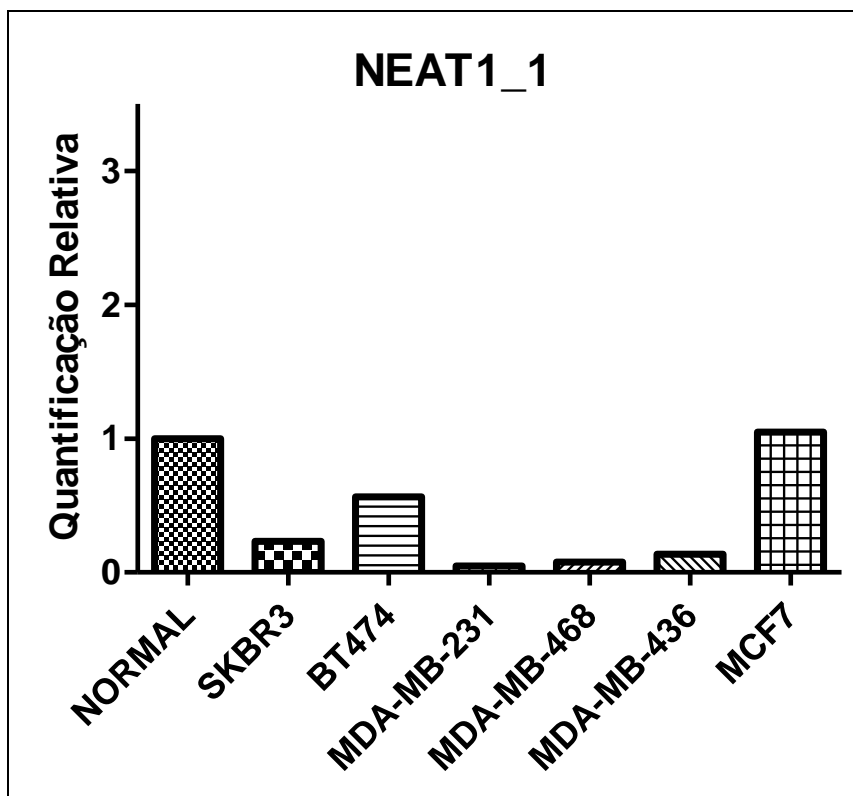


GRÁFICO 3. GRÁFICO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE EXPRESSÃO DE NEAT1_1 EM DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. FONTE: O autor (2017).

Apesar de haver trabalhos que relatam a alta expressão de NEAT1 estar relacionadas ao câncer de mama (ZHANG *et al.*, 2017; KE *et al.*, 2016), os resultados obtidos mostraram que as linhagens triplo-negativas, MDA-MB-231, MDA-MB-468 e MDA-MB-436, tiveram níveis quase 10 vezes mais baixos do que a linhagem normal. Esses dados podem refletir algum mecanismo de ação deste lncRNA ainda não conhecido.

É importante lembrar que o presente trabalho avaliou a expressão de todos os lncRNAs apenas em linhagens celulares e não em amostras de pacientes, o que ressalta a importância de avaliar com maior cautela os estudos realizados com linhagens, uma vez que podem não refletir a biologia tecidual do tumor em seu contexto real. Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliar a relação existente entre a baixa expressão de NEAT1_1 em linhagens de câncer de mama e também amostras de pacientes, principalmente para aquelas apresentam um perfil mais agressivo, com as triplas negativas (DAI *et al.*, 2017).

O lncRNA AC008771.1, mostrou um aumento de expressão em linhagens luminal A (MCF-7) e luminal B (BT474) e diminuição nas linhagens triplas negativas (MDA-MB-231, MDA-MB-468 e MDA-MB-436) e HER2 (SKBR3) (GRÁFICO 4). Os subtipos luminais têm em comum expressão positiva de ER, são comparativamente mais diferenciadas e têm menor propensão para a migração, na medida em que os demais subtipos apresentam em comum à expressão negativa de ER e apresentam mais agressividade em relação à migração celular quando comparadas com as células luminais. Diante disso, os resultados sugerem que o nível de expressão desse lncRNA pode ser útil na identificação dos subtipos tumorais, dado que sua expressão está 2 a 3 vezes maior em linhagens RE positivas em relação as linhagens ER negativas.

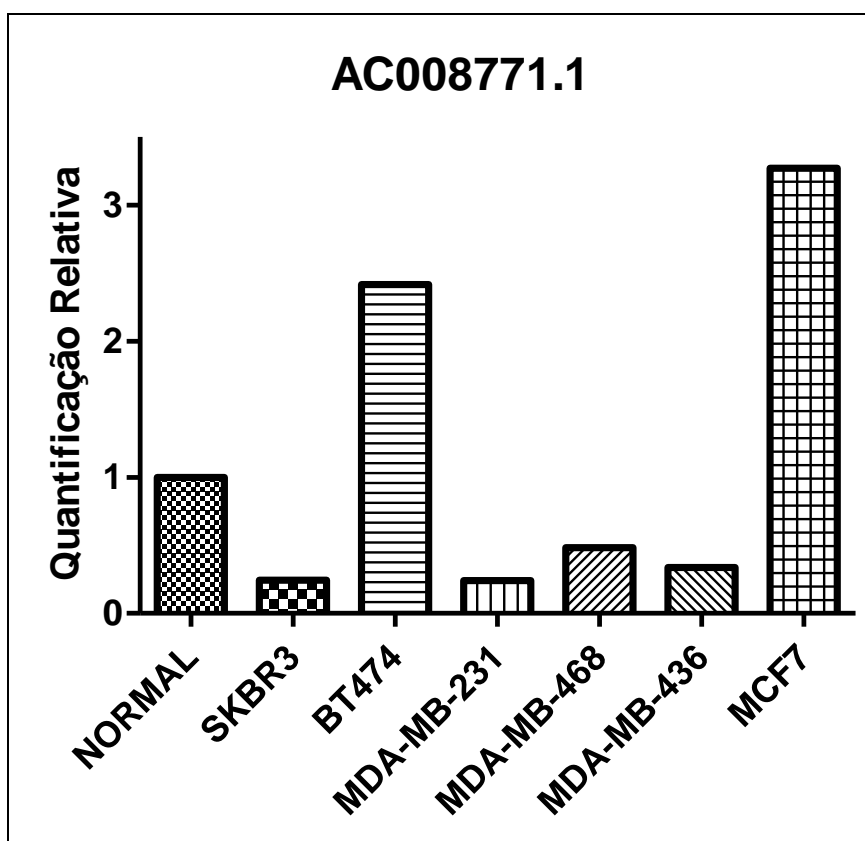


GRÁFICO 4. GRÁFICO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE EXPRESSÃO DE AC008771.1 EM DIFERENTES LINNHAGENS TUMORAIS DE MAMA. FONTE: O autor (2017).

Ainda não há nem um trabalho descrito na literatura que tenha relatado o envolvimento desse gene em algum processo relacionado ao câncer, entretanto esse lncRNA foi selecionado no banco de dados por apresentar expressão diferencial entre paciente com diferentes subtipos de câncer de mama. Os

resultados mostraram que esse lncRNA apresenta super expressão em linhagens que compreendem cerca de dois terços dos carcinomas de mama, que são positivos para RE e que geralmente respondem melhor à terapia hormonal.

Esses resultados sugerem a importância deste lncRNA, tanto em processos relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama, quanto sua utilização como possível biomarcador para os subtipos mais frequentes no câncer de mama. Ao visualizarmos os dados de expressão de todas as linhagens para os três lncRNAs é possível notar que cada um apresenta um padrão de expressão distinto em cada uma das linhagens estudadas, sendo a continuidade dos estudos bastante promissora na busca para o melhor entendimento de suas funções. (GRÁFICO 5).

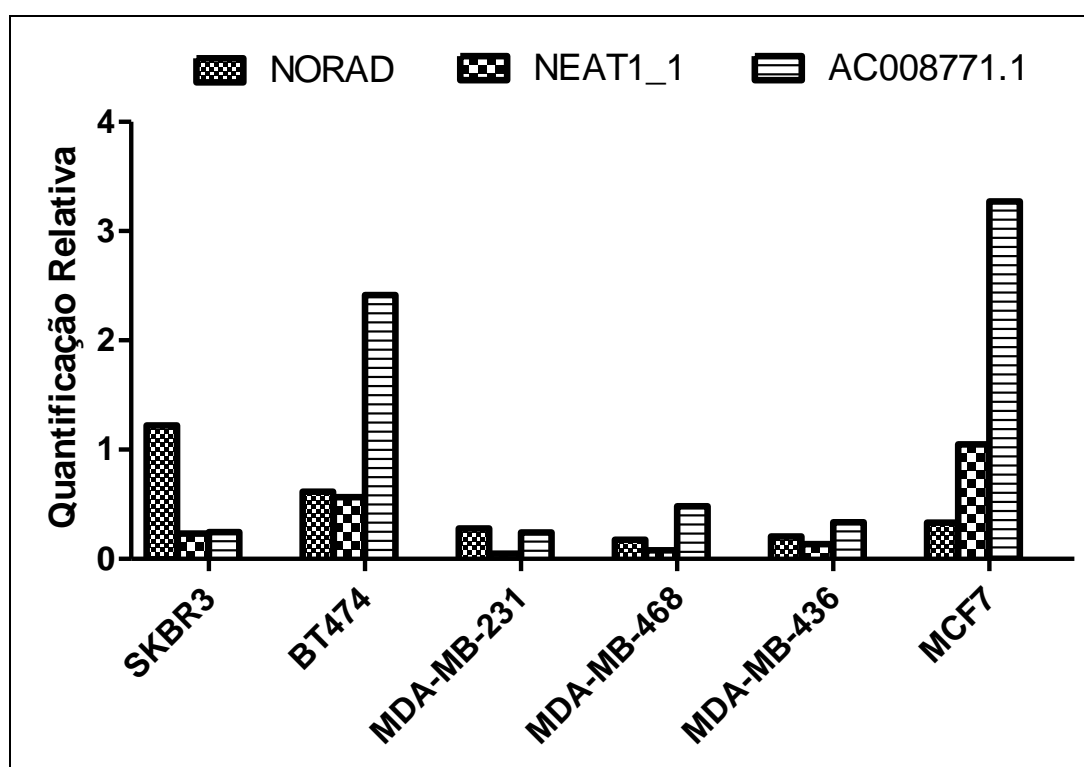


GRÁFICO 5. GRÁFICO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE EXPRESSÃO DOS TRÊS lncRNAs EM DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. FONTE: O autor (2017).

Os grandes avanços na biologia molecular, ocorridos na última década, contribuíram bastante para o desenvolvimento dos marcadores tumorais. Uma possibilidade para a diminuição de mortalidade relacionada ao câncer de mama seria encontrar marcadores que possam identificar precocemente pacientes que apresentem tumores potencialmente agressivos e que também possam ser utilizados para o direcionamento do tratamento do câncer. A identificação de

lncRNAs como potenciais biomarcadores e/ou alvos moleculares abre novas possibilidades na conduta diagnóstica e terapêutica do câncer de mama.

7 CONCLUSÃO

Os lncRNAs são uma classe emergente de moléculas que vem mostrando, apresentar importância em vários processos relacionados ao câncer de mama. Os lncRNAs avaliados no presente trabalho, mostraram expressão diferencial entre as diferentes linhagens, sugerindo seu potencial papel como biomarcadores. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender como esses lncRNAs se comportam não somente em linhagens mas também em amostras de pacientes, afim de avaliar como seu uso pode contribuir na conduta diagnóstica e terapêutica do câncer de mama.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENS, C. et al. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. **Nat Med.** 22:861-868, 2016.

Al TAMIMI, D. M. et al. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer--a Saudi population based study. **BMC Cancer**, 2010.

ALLRED, D. C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast cancer research: BCR.** London, v. 6, p. 240–245, 2004.

AMERICAN CÂNCER SOCIETY. 2008. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_is_breast_cancer_5.asp>. Acessado em outubro de 2017.

ARD, R.; TONG, P.; ALLSHIRE, R, C. Long non-coding RNA-mediated transcriptional interference of a permease gene confers drug tolerance in fission yeast. **Nature Communications**, v. 5, p. 5576, 2013.

AZZALIN, C. M. et al. "Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends." **Science** 318(5851): 798-801, 2007.

BAIRD, P. The Human Genome Project, genetics and health. **Community Genet.** 4, 77-80, 2001.

BAKER, M. Long noncoding RNAs: the search for function. **Nature Methods**, v. 8, n. 5, p. 379-383, 2011.

BALLANTYNE, M. Understanding the role of long non-coding RNA (lncRNA) in vascular pathology. PhD thesis, University of Glasgow, 2017. Disponível em <http://theses.gla.ac.uk/8101>. Acesso em 10/10/17.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER B. The genetics and genomics of cancer. **Nat Genet.**33 Suppl:238-44, 2003.

BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer.** 109(9):1721-8, 2007.

BATEMAN, A. C. Breast pathology. **Surgery.** 25(6):245-250, 2007

BELTRAN, M. et al. "A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition." **Genes Dev** 22(6): 756-769, 2008.

BERTUCCI, F. P. et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. **Cancer Res.** B May 1; 66(9):4636-44, 2006.

BIRNBAUM, D. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? **Int J Oncol.** 2004.

BISSEL, M. J.; RADISK, D. Putting tumours in context. **Nat Rev Cancer**, 1, 46-54, 2001.

BRUNNER, A. L. et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. **Genome Biol.** 13, R75, 2012.

CABILI, M.N. et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. **Genes Dev.** 15, 1915–1927, 2011.

CAREY, L. A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemo sensitivity of breast cancer subtypes. **Clin Cancer Res.** 13(8):2329-34, 2007.

CARDINALE, S. et al. Subnuclear localization and dynamics of the Pre-mRNA 3' end processing factor mammalian cleavage factor I 68-kDa subunit. **Mol Biol Cell.** 18: 1282–1292, 2007.

CHA, Y. J.; JUNG, W-H.; KOO, J. S. The Clinicopathologic Features of Molecular Apocrine Breast Cancer. **Korean J Pathol.** 46(2): 169–176, 2012.

CHAKRAVARTY, D. et al. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. **Nat Commun.** 5:5383, 2014.

CHARAFE-JAUFFRE, E. et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. **Oncogene.** 25, 2273–2284, 2006.

CHEN, L. L.; CARMICHAEL, G. G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: Functional role of a nuclear noncoding RNA. **Mol Cell**, .2009.

CHEN, Z. J. et al. Clinical significance of up-regulated lncRNA NEAT1 in prognosis of ovarian cancer. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2016; 20:3373-3377.

CHOUDHRY, H. et al. Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2alpha dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. **Oncogene.** 34:4482–4490, 2015.

CLARK, M. B.; MATTICK, J. S. "Long noncoding RNAs in cell biology." **Semin Cell Dev Biol** 22(4): 366-376, 2011.

COSTA, F. F. Non-coding RNAs: Lost in translation? **Gene**, v.386, p. 1-10, 2007.

COMINGS, D. E. The structure and function of chromatin, **Adv. Hum. Genet.** 3 (1972) 237–431.

DAI, X.; CHENG, H.; BAI, Z.; LI, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer.** 8(16): 3131-3141, 2017.

DERRIEN, T. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Research**. 22, 1775-1789, 2012.

DONTU, G. et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell proliferation**. Oxford, v. 36 (Suppl. 1), p. 59 -72, 2003.

DVORKIN-GHEVA, A.; HASSELL, J. A. Identification of a novel luminal molecular subtype of breast cancer. **Plos One**, v.9(7). 2014.

EHEMAN, C. R. et al. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas. United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 6, p. 1763–1769, 2009.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**. 38(6):698-707, 2012.

FANG, J. et al. High expression of long non-coding RNA NEAT1 indicates poor prognosis of human cancer. **Oncotarget**. Vol. 8, (No. 28), pp: 45918-45927, 2017.

FATICA, A.; BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. **Nat. Rev. Genet**. 15, 7–21, 2014.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 (**International Agency for Research on Cancer**, Lyon, 2012).

FERLAY, J. et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010. **Lancet**, v. 379, n.9824, p. 1390-1391, 2012.

GABORY, A.; JAMMES, H.; DANDOLO, L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. **Bioessay** 32:473–80, 2010.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology** 24: 2206–2223, 2013.

GIULIANO, A. E. et al. Breast Cancer—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **A Cancer Journal for Clinicians**. 67:290–303, 2017.

GUPTA, R. A. et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**. 464, 1071–1076, 2010.

GUTTMAN, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature** 458, 223–227, 2009.

GUTTMAN, M. et al. "lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation." **Nature** 477(7364): 295-300, 2011.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 703-719, 2012.

HAN, P.; CHANG, C. P. Long non-coding RNA and chromatin remodeling. **RNA Biology**. v. 12, n. 10, p. 1094-1098, 2015.

HANSJI, H. et al. Keeping abreast with long non-coding RNAs in mammary gland development and breast cancer. **Front Genet** 5: 379, 2014.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Information networks in the mammary gland. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 9, p. 715-725, 2005.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol.** 2007;8(5):R76. PubMed PMID: 17493263; PubMed Central PMCID: PMC1929138.

HESSELS, D. et al. DDE (PCA3)- based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. **Eur Urol** 2003; 44:8-15.

HU, G. et al. "Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation." **Nat Immunol** 14(11): 1190-1198, 2013.

HU, X. et al. The role of long noncoding RNAs in cancer: the dark matter matters. **Current Opinion in Genetics & Development**. 2018, 48:8–15, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER- Estimativa de Câncer no Brasil. INCA, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>. Acesso em 15/07/2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. INCA, 2012.

IYER, M. K. et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. **Nat. Genet.** 47, 199–208, 2015.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin.**61(2):69-90, 2011.

JIA, Q. et al. The regulatory effects of long noncoding RNA-ANCR on dental tissue-derived stem cells. **Stem Cells Int** 2016:3146805. doi:10.1155/2016/3146805, 2016.

JURACEK, J.; ILIEV, R.; SVOBODA, M.; SLABY, O. Long noncoding RNAs in breastcancer:implicationsforpathogenesis,diagnosis,andtherapy. In: Barh D, editor. Omics approaches in breast cancer. India: **Springer**. p. 153–70, 2014.

KALLEN, A. N. et al. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. **Molecular Cell**, v. 52, n. 1, p. 101-112, 2013.

KHALIL, A. M. et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106, 11667–1167, 2009.

KASSUBE, A. S. et al. Structural insights into transcriptional repression by noncoding RNAs that bind to human Pol II. **J Mol Biol**, 2012.

KE, H. et al. NEAT1 is required for survival of breast cancer cells through FUS and miR-548. **Gene Regul Syst Bio**. 10:11-17, 2016.

KOBOLDT D. C. F. R. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 490(7418):61–70, 2012.

LaBARGE, M. A.; PETERSEN, O. W.; BISSELL M. J. Of microenvironments and mammary stem cells. **Stem Cell Reviews**, v. 3, n. 2, p. 137-146, 2007.

LEE, S. et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins. **Cell**. 164, 69-80, 2016.

LI, C. et al. A self-enhanced transport mechanism through long noncoding RNAs for X chromosome inactivation. **Sci Rep** 6:31517, 2016.

LI, L.; CHANG, H. Y. Physiological roles of long noncoding RNAs: insight from knockout mice. **Trends Cell Biol**. 24, 594–602, 2014.

LOUWMAN, W. J. et al. On the rising trends of incidence and prognosis for breast cancer patients diagnosed 1975-2004: a long-term population-based study in southeastern Netherlands. **Cancer Causes & Control**, v. 19, n. 1, p. 97-106 (2008).

MAHSHID, G.; ZAHRA, P.; HAMID, S. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 17, **Cancer Control in Western Asia Special Issue**, 2016.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clin Med Insights Pathol**. 8: 23–31, 2015

MALIH, S.; SAIDIJAM, M.; MALIH, N. A brief review on long noncoding RNAs: a new paradigm in breast cancer pathogenesis, diagnosis and therapy. **Tumour Biology**, 2015.

MARKS, L. S. et al. NPCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. **Urology**. 69(3):532–5. 58, 2007.

MATOUK, I. J. et al. Highly upregulated in liver cancer noncoding RNA is overexpressed in hepatic colorectal metastasis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**.21(6):688–92, 2009.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human Molecular Genetics**, v. 15, R17-29, 2006.

MENG, J.; ZHANG, Q.; YANG, Z.; FU, S. A four-long non-coding RNA signature in predicting breast cancer survival. **J Exp Clin Cancer Res**. 33(1):84, 2014.

MULLER, N. et al. Interleukin-6 and tumour necrosis factor- α differentially regulate lincRNA transcripts in cells of the innate immune system in vivo in human subjects with rheumatoid arthritis. **Cytokine** 68, 65–68, 2014.

NAGANUMA, T.; HIROSE, T. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs. **RNA Biol**. 10:456–461, 2013.

NIE, N. et al. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. **American Journal of Translational Research**, v. 4, n. 2, p. 127-150, 2012.

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**. 10(16):5367- 74, 2004.

NOBILI, L.; LIONETTI, M.; NERI, A. Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. **Oncotarget** 7:50666–81, 2016.

OLDENBURG, R. A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer : How many more genes to be found ? **Oncology Hematology**. p.125-149. 2007.

OREL, S. G. et al. MR imaging of ductal carcinoma in situ. **Radiology**. v.202, p. 413-420, 1997.

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**. 27: 11601167, 2009

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

POLYAK, K. Heterogeneity in breast cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3786-3788, 2011.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**. v.12, 2010.

RAINIER, S. et al. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature** 1993, 362(6422):747-749.

REIS-FILHO, J.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **The lancet**. v.378. 2011.

RINN, J. L. et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. **Cell**. 2007;129(7):1311–23.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Modern Pathology**. v. 23, p. S60-S64, 2010.

SCHMIDT, L. H. et al. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth. **J Thorac Oncol**. 2011;6(12):1984–92.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.

SILVA, J. M. et al. LSINCT5 is over expressed in breast and ovarian cancer and affects cellular proliferation. **RNA Biol**. 8, 496–505, 2011.

SHI, X. et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. **Cancer Lett**. 339:159–166, 2013.

SOMAROWTHU, S. et al. HOTAIR forms an intricate and modular secondary structure. **Mol Cell**. 58:353–61, 2015.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**. 98(19):10869- 74, 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**. 100(14):8418-23, 2003.

STANDAERT, L. et al. The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation. **RNA**. 20, 1844–1849, 2014.

St. LAURENT, G.; WAHLESTEDT, C.; KAPRANOV, P. The Landscape of long noncoding RNA classification. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 5, p. 239-251, 2015.

STINGL, J.; CALDAS, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7(10), p. 791-799, 2007.

SU, X. et al. Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. **Oncotarget**, v. 5, n. 20, p. 9864-9876, 2014.

TAFT, R. J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J. S. "The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity." **Bioessays**. 29(3): 288-299, 2007.

TAFT, R.J. et al. Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. **Nat Genet** 2009, 41(5):572-578.

TANG, W. et al. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. **PLoS One**.;7(12), 2012.

TIEZZ, D. G. Epidemiologia do câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 2009.

TICHON, A. et al. A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. **Nature Communications**. 7:12209, 2016.

TINZL, M. et al. DDE3PCA3 RNA analysis in urine -a new perspective for detecting prostate cancer. **Eur Urol**. 46:182-6, 2004.

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. Baltimore, USA. Disponível em: <http://www.hopkinsmedicine.org/avon_foundation_breast_center/breast_cancers_other_conditions/invasive_ductal_carcinoma.html>, 2014. Acesso em: 20/09/2017.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**,65, 87-108, 2015.

TRIPATHI, V. et al. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. **Plos Genet** 9:e1003368, 2013.

ULITSKY, I.; BARTEL, D.P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. **Cell** 154, 26–46, 2013.

VALENTIN, M. D. et al. Molecular insights on basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.134, p. 21-30, 2012.

VAN GILS, M. P. et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. **Clin Cancer Res.** 13(3):939–43. 6, . 2007;

VAN T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature.** 415(6871):530-6, 2002.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer.** v. 7, p. 659 – 672. 2007.

VIEIRA, D. S. et al. Breast cancer: new concepts in classification. **Rev Bras Ginecol Obstet.** Jan;30(1):42-7, 2008.

VIKRAM, R.; RAMACHADRAN, R.; ABDUL, K. Functional significance of long non-coding RNAs in breast cancer. **Breast Cancer.** 21(5): 515–21, 2014.

VILLADSEN, R. et al. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. **The Journal of cell biology**, New York , v. 177(1), p. 87-101, 2007.

XIANGUO, C. et al. Promoting progression and clinicopathological significance of NEAT1 over-expression in bladder cancer. **Oncotarget.** 2016.

ZHANG, H. M. et al. High expression of long non-coding RNA SPRY4-IT1 predicts poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 7: 5801-5809, 2014.

ZHANG, Q. et al. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. **MBio.** 4(1):e596–12, 2013.

ZHANG, M. et al. lncRNA NEAT1 is closely related with progression of breast cancer via promoting proliferation and EMT. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences.** 21: 1020-1026, 2017.

ZHU, Y. et al. ncRNA, a newly identified long noncoding RNA, enhances human bladder tumor growth, invasion, and survival. **Urology.**77(2):510, 2011.

WAN, G. et al. "A novel non-coding RNA lncRNA-JADE connects DNA damage signalling to histone H4 acetylation." **EMBO J**, 2013.

WALDRON, C.; LACROUTE, F. Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. **J. Bacteriol.** 122, 855–865. 1975.

WANG, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. **Molecular Cell** 43, September 16, 2011.

WANG, J. et al. CREB upregulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. **Nucleic Acids Res.** 38(16):5366–83, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme 2010. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 27/08/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer today. Disponível em<http://gco.iarc.fr/today/onlineanalysismultibars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default> Acesso em: 20/08/2017.

YANG, G.; LU, X.; YUAN, L. LncRNA: a link between RNA and cancer. **Biochim Biophys Acta.** 1839(11):1097–109. 2014.

YOON, J. H.; ABDELMOHSEN, K.; GOROSPE, M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. **J Mol Biol.** 425:3723–30, 2013.

YOU, J. et al. MicroRNA-449a inhibits cell growth in lung cancer and regulates long noncoding RNA nuclear enriched abundant transcript 1. **Indian J Cancer.** 2014.

YU, X. et al: A novel cancer- related long non- coding RNA. **Cell Proliferation,** 2017.

YUMEI, Z.; YANG, T.; QI, L.. Long noncoding RNA: a crosslink in biological regulatory network. **Briefings in Bioinformatics,** 2017.