



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
GUILLERMO ORTIZ BRASIL

IAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIR-142-5P E MIR-150-5P EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE
MAMA DOS SUBTIPOS LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO

CURITIBA, 2020

GUILLERMO ORTIZ BRASIL

IAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIR-142-5P E MIR-150-5P EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE
MAMA DOS SUBTIPOS LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO

Dissertação apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em genética, Departamento de genética, Setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em genética.

Orientadora: prof^a. Dra. Enilze maria de souza fonseca ribeiro

Coorientador: prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Brasil, Guillermo Ortiz.

Avaliação da expressão do miR-142-5p e miR-150-5p em carcinomas primários de mama dos subtipos Luminal A e triplo negativo. / Guillermo Ortiz Brasil. – Curitiba, 2020.

53 f. : il.

Orientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro.

Coorientador: Iglênir João Cavalli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Câncer. 2. Biomarcadores. 3. Mamas - Tumores. 4. MicroRNAs. I. Título. II. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca. III. Cavalli, Iglênir João. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 615.82



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **GUILLERMO ORTIZ BRASIL** intitulada: **Avaliação da expressão do miR-142-5p e miR-150-5p em carcinomas primários de mama dos subtipos Luminal A triplo negativo**, sob orientação da Profa. Dra. ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO, que após terem inquirido o aluno realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

13/04/2020 10:10:41.0

ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 10:40:14.0

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/04/2020 10:16:43.0

BRUNA MAYUMI SUGITA

Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro que tenho uma grande admiração, gostaria de agradecer por ter me aceitado no laboratório e por ter me dado essa oportunidade. Obrigado pela excelente orientação durante esses anos em que estive em seu laboratório. Obrigado pela sua paciência comigo.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Iglénir João Cavalli que tenho profunda admiração por sua história e pela pessoa incrível que é. Obrigado pelas conversas durante esses anos. Agradeço por todo o apoio e orientação.

Às voluntárias que participaram para a realização deste projeto; à Tayana Schultz e Tamyres M. Carvalho, por terem nos auxiliado em todos os experimentos; ao Dr. André Garcia, pela ajuda com a análise de bioinformática; Érika Zambalde Pereira, por ajudar quando possível, e a todos que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também aos meus colegas do LabCHO, em especial à Ana Flávia, Ana Luísa Mattana, Carolina Mathias, Leandro Garcia e Rafael Diogo Marchi, por todos os bons momentos. Obrigado pela amizade!

À Sarah e Jéssica, que me acompanharam durante a execução do projeto. Gostaria de agradecer também às Dras. Jaqueline Carvalho de Oliveira e Daniela Fiori Gracia pela ajuda com os experimentos e com as discussões sobre.

À minha família, por todo o incentivo, amor e carinho. Gostaria de agradecer em especial à minha vida, Tamires Leite Costa, que sempre esteve presente me apoiando e me dando força. Obrigado por tudo. Te amo muito.

Aos meus amigos e amigas da vida, que a cada ano me enchem de felicidade e amor. Obrigado por existirem.

A meu amigo, Dr. Pedro Henrique dos Santos Dias, por todos os conselhos, ajuda e apoio.

Agradeço aos órgãos de fomento às pesquisas, CNPq, Fundação Araucária e a FAPESP, cujo financiamento proporcionaram a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos que também contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigado!

“There is nothing more valuable than a friend”

Qui-Gon Jinn

RESUMO

O câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo com 2,1 milhões de casos até o ano de 2018. Novas perspectivas para o diagnóstico, direcionamento terapêutico e prognóstico tem surgido através da análise de miRNAs. Os miRNAs são uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificadoras com aproximadamente 18–25 nucleotídeos que desempenham papel importante no desenvolvimento de diversas doenças humanas, incluindo o câncer. Dentre os miRNAs, estão considerados possíveis candidatos para biomarcadores do câncer de mama, os miR-142-5p e miR-150-5p. O objetivo geral deste trabalho é verificar a expressão dos miR-142-5p e miR-150-5p em tecido tumoral e não tumoral (adjacente ao tumor) de mulheres com carcinomas primários de mama e comparar se há concordância com os resultados de expressão obtidos na biópsia líquida, avaliando, assim, na avaliação destes como potenciais biomarcadores. Setenta e três amostras tumorais e 60 não-tumorais (CT) foram submetidas à extração de RNA total, incluindo mRNAs e miRNAs, realizada por meio do kit comercial *miRNeasy® Mini Kit* (Qiagen). As reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para avaliação dos níveis de expressão dos miRNAs foram realizadas por meio de ensaios *TaqMan®*. Além disso, os bancos de Dados “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA) e “*OncomiR Cancer Database*” (OMCD) foram utilizados para análise *in silico*. A análise de expressão dos miRNAs miR-142-5p e miR-150-5p foi realizada em todas as 133 amostras. O miR-142-5p apresentou nível de expressão mais elevado nas amostras de tecido tumoral quando comparadas com CT ($p < 0,05$). Foi realizada análise comparando o subtipo luminal A com o triplo negativo (TN). O miR-142-5p apresentou alto nível de expressão no subtipo TN quando comparado ao grupo CT ($p < 0,05$). O miR-150-5p demonstrou baixo nível de expressão nas amostras tumorais quando comparadas ao grupo CT ($p < 0,005$). Na análise entre os subtipos, o miR-150-5p é significativamente menos expresso no subgrupo LA quando comparado ao CT ($p < 0,005$). A expressão do miR-142-5p apresentou comportamento semelhante aos resultados obtidos na biópsia líquida (análise em microvesículas) na comparação entre tumores e controles, contribuindo, assim, na avaliação destes como potenciais biomarcadores para diagnóstico. Esse achado é concordante ao encontrado na análise *in silico*, porém é divergente do padrão predominante na literatura. Em resumo, não encontramos um padrão concordante com os resultados provenientes da biópsia líquida (com exceção da comparação entre amostras tumorais e não-tumorais) ou da maioria dos resultados publicados, em especial para o miR-150-5p demonstrando a necessidade de maior investigação nos estudos envolvendo miRNAs para que possa ser finalmente demonstrado seu potencial para utilização na prática clínica.

Palavras-chave: biomarcadores, câncer de mama, luminal A, , triplo-negativo, microRNAs, miR-142-5p, miR-150-5p. .

ABSTRACT

Breast cancer is the second most incident in the world with 2.1 million cases until 2018. New techniques for diagnosis, therapeutic targeting and prognosis have emerged through the analysis of miRNAs. MiRNAs are a class of small non-coding RNA molecules with approximately 18–25 nucleotides that play an important role in the development of several human diseases, including cancer. Among the miRNAs, the miR-142-5p and miR-150-5p are possible candidates for biomarkers for breast cancer. The general objective of this work is to verify the expression of miR-142-5p and miR-150-5p in tumoral and non-tumoral tissue (adjacent to the tumor) of women with primary breast cancer and to verify if there is agreement with the expression results obtained in liquid biopsy, contributing to their evaluation as potential biomarkers. Seventy-three tumor and 60 non-tumor samples were subjected to total RNA extraction, including mRNAs and miRNAs, performed using the commercial miRNeasy® Mini Kit (Qiagen). The real-time quantitative PCR reactions (RT-qPCR) to evaluate the expression levels of the miRNAs were performed using TaqMan® assays. In addition, the databases “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) and “OncomiR Cancer Database” (ONCOMI) were used for *in silico* analysis. Expression analysis of miRNAs miR-142-5p and miR-150-5p was performed on all 133 samples. MiR-142-5p showed a higher level of expression in tumor samples when compared to CT ($p < 0.05$). An analysis was performed comparing the luminal A (LA) and triple negative (TN). MiR-142-5p showed higher level of expression in the TN group when compared to the CT group ($p < 0.05$). MiR-150-5p demonstrated lower level of expression in tumor samples when compared to the CT group ($p < 0.005$). In the analysis between subgroups, miR-150-5p was significantly less expressed in the LA subgroup when compared to CT ($p < 0.05$). The miR-142-5p expression showed a behavior similar to the results obtained in liquid biopsy analysis (microvesicles) when comparing tumors and controls, thus contributing to their evaluation as potential biomarkers for diagnosis. This finding corresponds to that found in the *in silico* analysis, but it diverges from the predominant pattern in the literature. In summary, we did not find a pattern consistent with the results from liquid biopsy (except for the comparison between tumor and non-tumor samples) or from most of the published results, especially for miR-150-5p demonstrating the need for a better standardization in studies involving miRNAs so that its potential for use in clinical practice can finally be demonstrated.

Keywords: biomarkers, breast cancer, luminal A, triple-negative, miRNAs, miR-142-5p, miR-150-5p.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMIA DA MAMA FEMININA.....	7
FIGURA 2- CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA.....	11
FIGURA 3- ESQUEMA ILUSTRATIVO DA BIOGÊNESE DO MIRNA.....	15
FIGURA 4- EXPRESSÃO DOS MIRNAS EM AMOSTRAS DE TECIDO DE CÂNCER DE MAMA DE DETERMINADO COM O DIAGNÓSTICO E SUBTIPOS.....	28
FIGURA 5- COMPARAÇÃO ASSOCIADOS AOS IDADE E GRAU DO TUMOR DAS AMOSTRAS.....	29
FIGURA 6- COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS COM PRESENCIA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AUXILIARES E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS DETERMINADO O TAMANHO DO TUMOR	30
FIGURA 7. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO MIR-142-5P ENTRE TUMORES DE TAMANHOS ≤ 50 mm QUANDO COMPARADAS	31

LISTA DE TABELAS

LA 1- DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ADOS PARA 2018 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA.....	8
LA 2- CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM A ANÁLISE DISTOQUÍMICA.....	13
LA 3- DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE A SEPARADOS NOS SUBTIPOS LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO	22
LA 4 - ANÁLISE DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DO MIR142-5p ENTRE OS SUBTIPOS ZADA COM DADOS DO TCGA.....	30
LA 5- ANÁLISE DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DO MIR150-5p ENTRE OS SUBTIPOS ZADA COM DADOS DO TCGA.....	30
LA 6. TIPOS DE CÂNCER EM QUE A TUMORIGÊNESE ESTÁ SIGNIFICATIVAMENTE CIADA À EXPRESSÃO DO HSA-MIR-142-5p.....	31
LA 7. TIPOS DE CÂNCER EM QUE A TUMORIGÊNESE ESTÁ SIGNIFICATIVAMENTE CIADA À EXPRESSÃO DO HSA-MIR-150-5p.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Carcinoma ductal *in situ*

Ácidos nucleicos livres na célula (do inglês, *cell free nucleic acids*)

Câncer de mama invasivo

Água livre de nuclease

- DiGeorge syndrome critical region gene 8

Carcinoma de células escamosas do esôfago

Gene humano de receptor de estrógeno do tipo alfa

Gene humano de receptor de estrógeno do tipo beta

Fator de crescimento epidérmico humano 2

Instituto nacional de câncer

LD- Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética

- RNAs longos não codificantes

Subtipo Luminal A

Câncer com invasão linfovascular

lncRNAs- microRNAs

Instituto Nacional do Câncer (do inglês, *National Cancer Institute*)

- RNAs não codificantes

Sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequencing*)

— Instituto Nacional de Pesquisas do Genoma Humano (do inglês, *National Human Genome Research Institute*)

Organização Mundial da Saúde

NA - Transcrito primário de miRNA

PCR quantitativa em tempo real

ceptores para androgênio

ceptores de estrogênio

RNA-*induced silence complex*

ceptor de progesterona

Pequenos RNAs de interferência

- Atlas do Genoma do Câncer (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*)

subtipo Triplo negativo

Transição epitelial-mesenquimal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
CÂNCER DE MAMA FEMININA	7
CÂNCER DE MAMA	7
ESTROGÊNIO, PROGESTERONA E ERBB2/ <i>HER2</i>	9
CLASSIFICAÇÃO DO CANCER DE MAMA	10
microRNAs	14
hsa-miRNA-150-5p e hsa-miRNA-142-5p	16
CLASSIFICATIVA	19
OBJETIVO	20
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
CHARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	21
EXTRAÇÃO DE RNAs	24
OBTENÇÃO DE cDNA	24
AValiação DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	24
ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS miRNAs NO TCGA	25
ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS miRNAs NO OncomiR	25
RESULTADOS	27
EXPRESSÃO DOS miRNAs EM AMOSTRAS COM CÂNCER DE MAMA	27
ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS COM PARÂMETROS CLÍNICO- OLÓGICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.	28
EXPRESSÃO DO <i>miR142-5p</i> e <i>miR150-5p</i> NAS AMOSTRAS DO TCGA	31
ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO <i>miR142-5p</i> e <i>miR150-5p</i> NAS AMOSTRAS DO OncomiR	34
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	43
PERSPECTIVAS	44
REFERÊNCIAS	45

INTRODUÇÃO

Câncer consiste em um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o aumento da proliferação e capacidade de invadir tecidos e órgãos e escapar do mecanismo de apoptose, podendo levar a formação de tumores malignos. Apesar da heterogeneidade, seis características comuns contribuem para o desenvolvimento de tumores malignos: evitar a sinalização proliferativa, evitar a ação de genes supressores e do apoptose, promover imortalidade celular, angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Estas características comuns orientam as pesquisas para a descoberta de novos biomarcadores para terapias, diagnósticos e prognósticos.

O câncer é um problema de saúde pública mundial; a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2018, mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo tiveram câncer e 9,6 milhões morreram com a doença. Até 2040, estima-se que os números dobrem (OMS, 2020). O câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo com 2,1 milhões de casos novos. Os tipos de câncer mais frequentes nas mulheres, foram câncer de mama (30%), cólon e reto (8%), pulmão (12%) e estômago (7%) (BRAY *et al.*, 2018; SIEGEL *et al.*, 2020).

Estima-se, para o Brasil, no triênio 2020-2022, a ocorrência de 625 mil casos novos de câncer (448 mil, excluindo o câncer de pele não melanoma), para cada ano. Os cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (30 mil) e pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) são os mais incidentes (INCA, 2020). Essa estimativa demonstra o perfil de incidência dos cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes, sendo que os cânceres de mama em mulheres são os mais frequentes (INCA, 2020).

As políticas públicas nessa área, em especial para o câncer de mama, vêm sendo desenvolvidas desde a década de 1970, com o estabelecimento da mamografia e o incentivo à realização do autoexame das mamas. Após o diagnóstico clínico, por palpação ou por exame de imagem, análises histológicas e moleculares auxiliam o diagnóstico precoce da doença e permitem o tratamento mais adequado (INCA, 2020). A correta classificação do câncer de mama em subtipos é determinante na definição do tratamento e, apesar da existência de marcadores bastante utilizados na prática clínica, há necessidade de mais estudos pesquisando novos biomarcadores que definam melhor a doença (e.g. DU *et al.*, 2016; FKIH M' *et al.*, 2017; KIAN, MORADI, GHORBAN, 2018; WANG *et al.*, 2019; OZAWA *et al.*, 2020).

A utilização da biopsia líquida através da análise de ácidos nucleicos circulantes — DNA e RNAs codificantes e não codificantes — tem trazido boas perspectivas diagnósticas, direcionamento terapêutico e prognóstico de portadores de diversas doenças, incluindo o câncer de mama (O'DRISCOLL, 2007; EIGELIENE, SAARENHEIMO, JEKUNE, 2018; RZAIE, BAGHERZADEH, AKBARI, 2019). Estes ácidos nucleicos podem estar na forma livre no plasma ou no soro, associados a células ou contidos em vesículas extracelulares, como os exossomos. Trabalhando com microRNAs (miRNAs) contidos

comos de mulheres portadoras de câncer de mama e controles sem câncer, o grupo do Laboratório de Citogenética e Oncogenética (LabCHO) detectou uma série de miRNAs diferencialmente expressos, possivelmente associados ao diagnóstico positivo para a doença. Dentre estes, observou-se que o miR-142-5p e miR-150-5p apresentaram níveis elevados de expressão em tumores do subtipo triplo negativo do que no luminal A, sendo que, o miR-142-5p potencializa o subtipo Luminal A. (OZAWA *et al.*, 2020).

O objetivo geral deste trabalho é verificar a expressão dos miR-142-5p e miR-150-5p em tecido tumoral e não tumoral (distante do tumor) de mulheres com carcinomas primários de mama e verificar se há concordância com os resultados obtidos na biópsia líquida, contribuindo, assim, na avaliação destes como potenciais biomarcadores.

VISÃO BIBLIOGRAFICA

MAMA FEMININA

A mama feminina é composta de células de tecido adiposo, tecidos conectivos e glândulas, que se estendem desde a clavícula até a axila e até o meio da caixa torácica. Em cada mama, há 15–20 seções chamadas lóbulos, que são compostas por glândulas menores produtoras de leite, que, por sua vez, são conectados ao mamilo através dos ductos. Os vasos sanguíneos, canais linfáticos e linfonodos auxiliares compõem o restante da glândula (Figura 1).

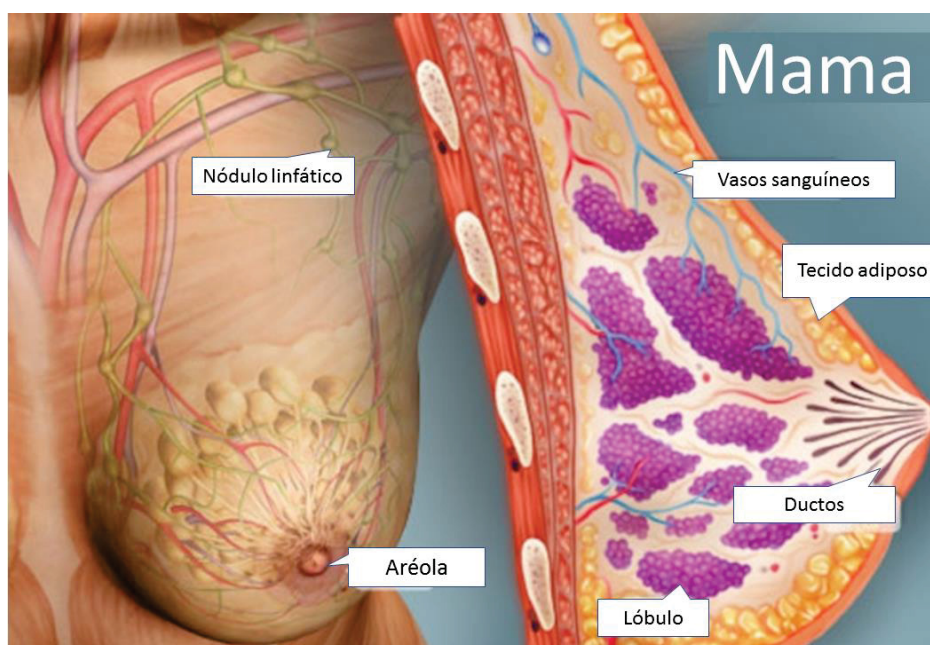


Figura 1 Anatomia da mama feminina. Fonte: Adaptado de WebMD LLC; 2014 < www.webmd.com/women/picture-of-the-breasts#1>

CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama em mulheres é o primeiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo e o segundo no Brasil (BRAY *et al.*, 2018; WHO 2020; INCA 2020), com estimativa de novos diagnósticos de câncer de mama de 2.8 milhões no mundo e 66.280 no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022 (Tabela 1) (INCA 2020).

FIGURA 1 DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA O BRASIL, POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	10.890	29,7%
Colón de reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FONTE: Instituto Nacional de Câncer – INCA (2020) NOTA: *Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

O tipo histológico de câncer de mama é determinado pelo local de origem do crescimento de células cancerosas (carcinoma lobular) ou ductos (carcinoma ductal). Devido ao processo de metástase, que ocorre em cerca de 30% das pacientes com diagnóstico em estágio inicial, o câncer de mama pode ser a principal causa de mortalidade (câncer de mama) entre as mulheres na maioria dos países do mundo (BRAY *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes aspectos histológicos, clínicos e respostas terapêuticas. Embora atualmente não exista uma causa clara, existe uma série de fatores de riscos conhecidos que contribuem para a uma maior ou menor suscetibilidade à doença. Alguns desses fatores de risco são a idade da mulher ao diagnóstico (KEY, GAMMON, JOHN, 1993), uso de anticoncepcionais (BERAL, REEVES, 1993), obesidade (ENGIN, 2000), menopausa tardia e altos níveis hormonais — incluindo estradiol, prolactina e fator de crescimento semelhante à insulina (VERKASALO 1999; KEY, VERKASALO, BANKS, 2001).

Estima-se que aproximadamente 10 a 30% dos casos de câncer de mama estejam relacionados a fatores hereditários, sendo que apenas 5 a 10% possuem herança monogênica apresentando mutações em genes de predisposição, por exemplo, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *TP53*, *PTEN* entre outros (APOSTOLOU *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015). Mutações deletérias nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, são sugeridas intervenções redutoras de risco,

ância magnética anual das mamas, mastectomia bilateral e salpingo-ooforectomia devido a 50-80% de chance de desenvolvimento de câncer de mama e de ovário (SASLOW *et al.*, 2007; DOMCHEK *et al.*, 2010 CARBINE *et al.*, 2018).

A metástase é a formação de uma nova lesão tumoral a partir da lesão primária localizada em uma região distante — ou seja, algumas células neoplásicas adquirem a capacidade de invasão, alcançando os vasos sanguíneos e migrando para um local distante onde formam uma nova colônia neoplásica, sendo a principal causa de mortalidade em pacientes com neoplasias malignas, responsáveis por 90% das mortes associadas a tumores sólidos (GUPTA, MASOUD, 2018). No câncer de mama, a metástase é caracterizada por uma disseminação via sistema linfático e/ou circulatório para os pulmões, fígado, cérebro e ossos (MÜLLER *et al.* 2001), sendo que o local de preferência depende do tipo de tumor, por exemplo, carcinomas ductais tendem a fazer metástases em linfonodos distantes, pulmões e sistema circulatório, enquanto os lobulares em peritônio, trato gastrointestinal e ovários (CHEN *et al.*, 2018). O câncer de mama metastático ainda representa uma doença com prognóstico desfavorável, tendo uma sobrevida média de dois a quatro anos dependendo do subtipo de câncer de mama (EROLES *et al.*, 2012).

ESTRÓGENIO, PROGESTERONA E ERBB2/HER2

O hormônio estrogênio promove o desenvolvimento e manutenção de características femininas, atuando através da ligação aos receptores de estrogênio (RE) — comumente encontrados em células mamárias normais. Quando ligados ao hormônio, o estrogênio atua no controle do crescimento, função e manutenção das células da mama. O aumento da proliferação das células da mama pode causar o acúmulo de mutações que, por sua vez, podem resultar no surgimento do câncer de mama. O excesso de estrogênio também pode produzir resíduos genotóxicos, e ambos os processos podem induzir crescimento celular anormal, evasão da apoptose e falha no reparo do DNA, podendo resultar na formação de tumores (DEROO, 2006).

Existem dois tipos de receptores de estrogênio que são expressos de forma diferente em diferentes tipos de tecidos do corpo humano. Os genes humanos receptores de estrógenos do tipo alfa (*ESR1*) e do tipo beta (*ESR2*) codificam as proteínas respectivas, que possuem funções muito distintas (DEROO,2006), tendo o *ESR1* maior importância no câncer de mama.

Assim como o receptor de estrogênio, a presença do receptor de progesterona (RP) também é avaliada no câncer de mama como fator prognóstico (HARRIS *et al.*, 2007). Semelhante à proteína RE, a RP existe em duas isoformas reconhecidas, porém essas formas são produtos do mesmo gene. A isoforma A é uma forma ligeiramente truncada da isoforma B, e as duas se associam para criar homo e heterodímeros (HAMMOND *et al.*, 2010).

O gene chamado oficialmente de *ERBB2* (também conhecido por *CD340*, *Neu*, ou, nome mais utilizado, a o receptor tirosina-quinase ERBB2 ou HER2. A família ERBB é composta de quatro tirosinas quinases rec à membrana plasmática, sendo o receptor HER2 um deles (ROSS *et al.*, 2003). O HER2 tem capacidade de dimerizar com qualquer um dos outros três receptores. A sua dimerização resulta na autofosforilação de resíduos no domínio citoplasmático dos receptores e ativa uma variedade de vias de sinalização — envolvidas na transdução de sinal, incluindo a via Ras/ativada por mitógeno-quinase, via *PI3K/Akt*, e a via *PLC-γ*, afetando a proliferação celular, sobrevivência, motilidade e aderência (ROSS *et al.*, 2003). A amplificação do gene *ERBB2* e/ou a superexpressão da proteína foram identificadas em 10% a 34% dos cânceres de mama invasivos (STERN, HEFFERNAN, WEINBERG, 2003). Em resumo, a sinalização através da família de receptores ERBB promove a proliferação celular e evita a apoptose. Portanto, deve ser rigidamente regulada para evitar que ocorra o crescimento celular descontrolado.

CLASSIFICAÇÃO DO CANCER DE MAMA

Existe uma diversidade fenotípica e de expressão gênica exibida pelos tumores mamários relacionada à heterogeneidade genotípica. Entre os anos de 1943 e 1952 Pierre Denoix desenvolveu o sistema TNM, uma classificação baseada por extensão anatômica da doença em que T significa a extensão do tumor primário, N é a ausência ou presença de metástase nos linfonodos auxiliares e M representa a ausência ou presença de metástase à distância (DENOIX, 1952; ELSTON, ELLIS, 1991; SOBIN *et al.*, 2011; MIRSADRAEE *et al.*, 2012).

Outro sistema de classificação é o de *Nottingham Histologic Score* (modificado por Elston-Ellis do sistema de Scarff-Bloom-Richardson) (BLOOM, 1957; ELSTON, ELLIS, 1991), onde é possível classificar o câncer de mama utilizando-se de diferenciação celular (quantidade de formação de glândulas, pleomorfismo e atividade mitótica). A avaliação da agressividade do câncer de mama foi possível a partir da análise de tais características histológicas, sendo os tumores classificados com grau I (baixo), esses são bem diferenciados e apresentam melhor prognóstico, grau II (intermediário) moderadamente diferenciados e grau III (alto), pouco diferenciados e de pior prognóstico.

No entanto, o câncer de mama pode ser classificado em subtipos moleculares para especificar a doença e determinar o melhor tratamento. Os cinco principais subtipos primeiramente definidos são luminal A, luminal B, semelhante ao medular (*medullary-like*), basal e com aumento de expressão de HER2 ou de sua via (Figura 2) (PEROU *et al.*, 2000; SORLIS *et al.*, 2003). Além desses subtipos, foram sugeridos mais dois subtipos: claudina baixa, definidos pela baixa expressão das claudinas 3, 4 e 7, E-caderina, CD24 e aumento da expressão de genes relacionados com a transição epitelial-mesenchimal (PRAT *et al.*, 2010) e o subtipo apócrino molecular, descrito pelo aumento da expressão do receptor de progesterona (FARMER *et al.*, 2005; SANGA *et al.*, 2009).

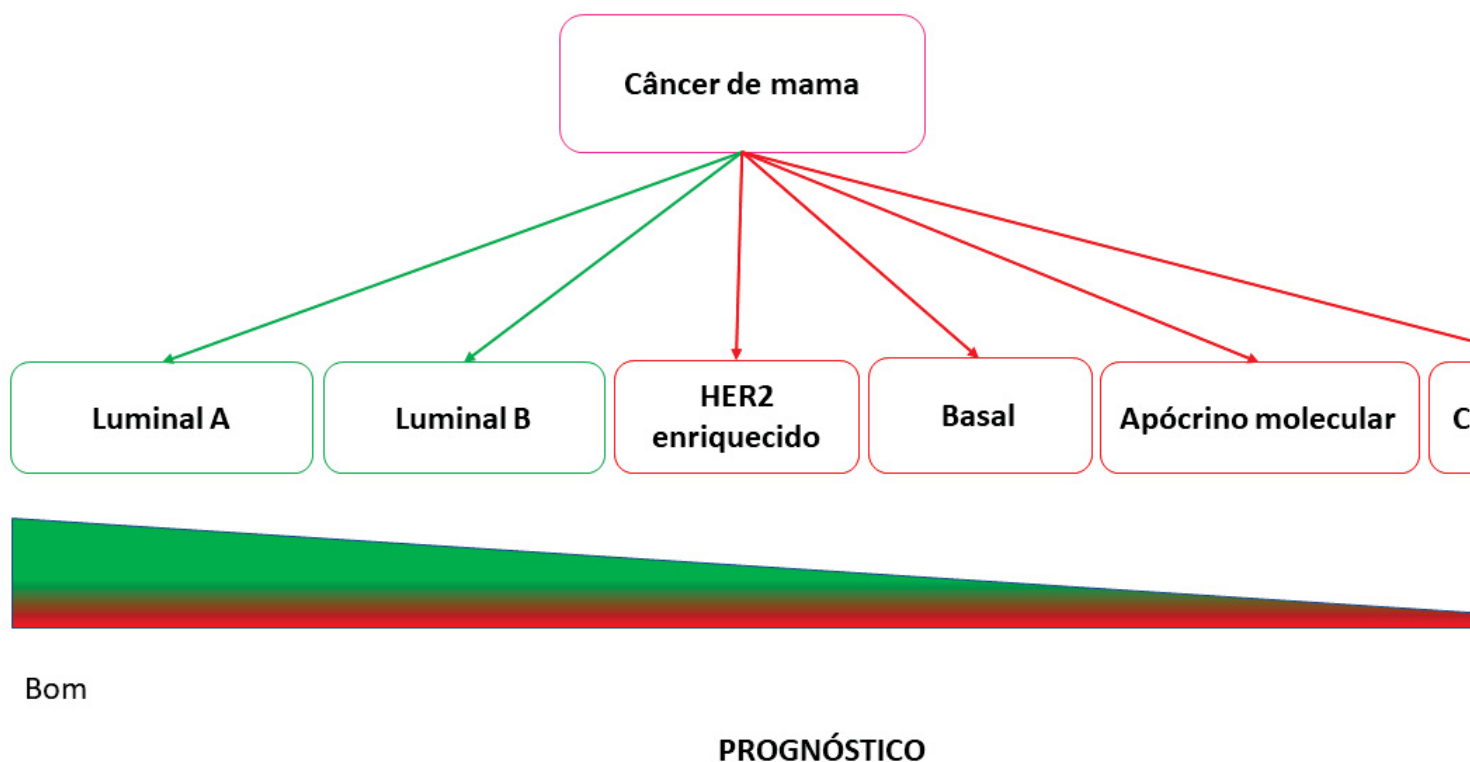


Figura 2 Classificação molecular dos subtipos de câncer de mama.

FONTE: modificado de VALENTIN *et al.*, 2012

O mais frequente é o subtipo luminal A, presente em 50-60% dos casos. Tendem a ser os mais receptivos aos tratamentos contra o câncer e à terapia hormonal, portanto, têm o melhor prognóstico e maiores taxas de sobrevivência (EROLES *et al.*, 2012).

O luminal B representa 20-25% dos casos de câncer de mama, e comparativamente ao luminal A, tem um comportamento mais agressivo, maior índice proliferativo, maior grau histológico e pior prognóstico. (EROLES *et al.*, 2012). Tendem a ter maiores taxas de recorrência e ter linfonodos positivos (com metástases), mas ainda possuem taxas de sobrevivência razoáveis.

O subtipo *HER2* enriquecido corresponde a cerca de 15-20% dos casos de câncer de mama. Apresenta uma alta expressão da proteína HER2 por amplificação do gene e/ou ativação dos genes da via regulada pelo *HER2*, resultando em altos índices de proliferação. O prognóstico é considerado desfavorável quando comparado aos outros subtipos (EROLES *et al.*, 2012). Este subtipo pode e deve ser tratado com medicamentos específicos que têm como alvo a via da HER2. (EROLES *et al.*, 2012)

O subtipo *basal like* corresponde de 10-20% dos casos de câncer de mama. Esse subtipo expressa genes que são encontrados no tecido mioepitelial da mama normal. É um tumor comum em mulheres mais jovens, possui alto grau histológico e metástases em linfonodos auxiliares são frequentes e seu prognóstico é desfavorável quando comparado com os subtipos *luminal* (EROLES *et al.*, 2012).

O *normal like* ocorre em 5-10% dos casos diagnosticados de câncer de mama. Este subtipo não apresenta uma definição clara definida, sendo muito controverso sobre ser ou não considerado um subtipo molecular. Alguns autores consideram como “contaminação” por células normais do estroma mamário (EROLES *et al.*, 2012).

O subtipo claudina baixa é definido pela alta expressão de marcadores da Transição Epitelial-Mesequimal e baixa expressão de genes relacionados à adesão celular (claudinas 3, 4 e 7), e baixa expressão de genes de marcos (EROLES *et al.*, 2012).

O subtipo apócrino molecular ocorre em 8-15% dos casos de câncer de mama e apresenta receptor de estrogênio positivo (RA) e negativo para receptor de estrógeno (LEE *et al.*, 2012). Esta subdivisão é de extrema importância para o estabelecimento do prognóstico e escolha do tratamento (PRAT *et al.*, 2010) e trouxe contribuições importantes para a vida das pacientes.

Apesar da classificação molecular ser importante para o prognóstico das pacientes, a implementação desse método torna-se mais difícil pois implica em um alto custo financeiro e maior tempo necessário para a realização. Por ocasião da Conferência de St. Gallen em 2011 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011), foi sugerida uma classificação simplificada baseada na imunohistoquímica dos tumores, atualizada em 2013 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013) este método é mais facilmente implementado para a implementação na prática oncológica (Tabela 2). As análises imunohistoquímicas são necessárias para definir se as células cancerosas são positivas ou negativas para o receptor de estrogênio, receptor de progesterona e aumento de expressão de HER2. Somou-se a estes marcadores, a análise da expressão de um marcador de proliferação celular, a proteína Ki-67.

Mesmo que a classificação histopatológica não consiga refletir de forma adequada a heterogeneidade do câncer de mama, os pacientes ainda são agrupados de acordo com tais critérios para definir a terapia adequada e avaliar o prognóstico. Em suma, os critérios utilizados para uma previsão do prognóstico e definição do tratamento incluem: idade do paciente, estágio histológico, tamanho do tumor, presença ou ausência de metástases em linfonodos ou à distância, presença/ausência de receptores de estrogênio, progesterona e aumento da expressão do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (NITT, 2010).

CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM A ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

SUBTIPO	RE/RP/HER2	Ki-67	PROGNÓSTICO
Luminal A	RE+RP+HER2	Baixo	Bom
Luminal B	RE+RP+/- HER2+	Baixo	Intermediário/Desfavorável
	RE+RP- HER2-	Alto	
HER2-positivo	RE-RP-HER2+	Alto	Desfavorável
Triplo Negativo	RE-RP-HER2-	Alto	Desfavorável

Legenda: RE, receptor de estrogênio, RP, receptor de progesterona, HER2, proteína codificada pelo oncogene *ERBB2/HER2*, Ki-67 biomarcador de proliferação celular.

Na classificação imunoistoquímica além dos subtipos luminal A, luminal B e HER2, foi determinado que quando o receptor de estrogênio, receptor de progesterona e *HER2* são negativos, o câncer de mama é classificado como “triplo negativo”. Cerca de 10 a 20% de todos os cânceres de mama são triplos negativos e esse tipo de câncer não responde à terapia hormonal ou a tratamentos específicos para super expressão de HER2. O câncer triplo negativo é mais agressivo que os outros tipos de câncer de mama, tendo baixa taxas de sobrevida. A combinação de inibidores da PARP com quimioterapia estão sendo estudadas como possibilidades de tratamento para esses pacientes (AYSOLA *et al.* 2016; DAN *et al.*, 2016; SCHMID *et al.* 2020).

Embora a classificação precisa dos subtipos tenha conduzido a uma diminuição das taxas de mortalidade, uma proporção de pacientes não responde à quimioterapia tradicional ou à terapia hormonal (ZAMBETTI *et al.*, 2016). O modelo utilizado não consegue prever o desfecho em diferentes pacientes, já que pacientes com as mesmas características tumorais podem apresentar respostas ao tratamento completamente diferentes (SCHNITT, 2010; SCHMID *et al.* 2020). Com tecnologias de alta resolução para análise de perfil de expressão dos genes, tais como micro-arranjo, RT-PCR e como o sequenciamento de nova geração (NGS), é possível investigar novos biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, além de possibilitar observar as diferentes respostas ao tratamento (IWAMOTO, PUSZTAI, 2010; SERRES *et al.* 2016; CHEN, ZHAO, 2019).

Nesse contexto, os miRNAs circulantes há anos estão sendo investigados como potenciais biomarcadores para a resposta ao tratamento (CHEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; SERRATÌ *et al.*, 2016), como “assinaturas de expressão” para classificar os diversos tipos de cânceres de mama com maior precisão (BLENKIRON *et al.*, 2007; GOOSSEN *et al.*, 2018), podendo determinar a identificação de novos subtipos moleculares (BHATTACHARYA *et al.*, 2015; BANDYOPADHYAY, 2015).

microRNAs

Os miRNAs são uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificadoras com aproximadamente 22 nucleotídeos (LEE, FEINBAUM, AMBROS, 1993). Foram descritos inicialmente no *Caenorhabditis elegans* (nematóide) e demonstrou que os miRNAs desempenham uma importante função na modulação da expressão gênica (LEE, FEINBAUM, AMBROS, 1993). A primeira evidência de miRNA desempenhando um papel no desenvolvimento do câncer foi encontrada no estudo da leucemia linfocítica crônica (CALIN *et al.*, 2002; BHASKARAN, MOHAN, 2014) e, nos anos seguintes, muitos estudos associaram os miRNAs associados a diversas doenças humanas (CROCE, CALIN, 2005; LUJAMBIO, LOWE, 2008). Por exemplo, síndrome de Feingold, perda auditiva progressiva autossômica dominante não síndrômica, doenças cardiovasculares (MENDELL, OLSON, 2012; SONG, AJANI, 2013), e diversos tipos de cânceres (BARTELS, TSONG, 2010; HENEGHAN *et al.*, 2010; SUGITA *et al.*, 2016; OZAWA *et al.*, 2020). No câncer podem atuar promovendo o desenvolvimento e progressão de tumores ou como supressor da tumorigênese (IORIO *et al.*, 2005; LAWRIE *et al.*, 2008; SELL *et al.*, 2008; SVORONOS *et al.*, 2016).

Os miRNAs são formados a partir de precursores, inicia-se com a transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, formando o transcrito de miRNA primário (pri-miRNA). O pri-miRNA apresenta uma estrutura em grampo (*hairpin*) e é clivado ainda no núcleo pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (do inglês *Di George syndrome critical region 8*). O pre-miRNA é transportado pela exportina-5 (proteína responsável pelo transporte dos miRNAs) para o citoplasma, onde são clivados por uma enzima, a Dicer, formando um duplex assimétrico (miRNA: miRNA*). Esse duplex se separa em duas moléculas de miRNA (5p e 3p), cada uma delas formando um miRNA maduro. Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (do inglês *RNA-induced silence complex*), que inclui as proteínas Argonaute 2 e 3 como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC podendo atuar por duas vias diferentes: uma onde marca o mRNA para ser degradado, e outra via onde se liga a um mRNA e inibe a expressão (Figura 3) (HE, HANNON, 2004; ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006; MUNKER, CALIN, 2011).

Os miRNAs participam da regulação da expressão de aproximadamente 30–60% dos genes humanos e têm importância na modulação dos seguintes processos celulares: proliferação, diferenciação, desenvolvimento e migração. Atuam na progressão do ciclo celular, angiogênese, transição epitélio-mesenquimal, renovação de células, apoptose, invasão e metástase (HAMAM *et al.*, 2017), sendo assim, possuem uma importante participação na biologia do câncer.

hsa-miRNA-150-5p e hsa-miRNA-142-5p

O hsa-miRNA-150-5p é uma sequência de miRNA com 22 nucleotídeos (UCUCCCAACCCUUGUACCAGU), está localizado no cromossomo 19q13.33 e está descrito em 5 bancos de dados (*miRBase*, *TarBase*, *RefSeq*, *LncBase*). Foi predito que a sequência do hsa-miR-150-5p do *Homo sapiens* interage com 177 genes codificadores de proteínas e 5 lncRNAs (rnacentral.org).

O hsa-miRNA-142-5p é uma sequência de miRNA com 21 nucleotídeos (CAUAAAGUAGAAAGCACUACU), está localizado no cromossomo 17q22 e está descrito em 5 bancos de dados (*miRBase*, *TarBase*, *RefSeq*, *LncBase*). Foi predito que a sequência hsa-miR-142-5p do *Homo sapiens* interage com 572 genes codificadores de proteínas e 5 lncRNAs (rnacentral.org).

Os miRNAs 142-5p e 150-5p estão envolvidos em vários tipos de câncer. No câncer humano podem ter ação oncogênica ou supressora de tumor em células originárias de diferentes tecidos. Por exemplo, a superexpressão do miR-142-5p promoveu significativamente um aumento da proliferação celular e a formação de colônias nas células RCC (células de carcinoma de células renais). O gene *BTG3* foi identificado como um alvo direto do miR-142-5p. O silenciamento de *BTG3* reverteu a proliferação celular induzida pelo miR-142-5p, sendo assim, este miRNA pode ser um alvo terapêutico no tratamento do CCR (LIU *et al.*, 2017),

Já o miR-150 é regulado positivamente em células B positivas para CD19 em leucemia linfocítica crônica (LLC), e regulado negativamente em leucemia mieloide crônica, leucemia linfoblástica aguda e linfoma não-Hodking de células B (PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2013; MRAZ *et al.*, 2014).

No carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço (HNSCC), uma análise da expressão de miRNA (miR-150-3p) constatou que esses miRNAs estão com expressão diminuída quando comparados com a expressão em tecidos normais, atuando como supressores de tumor em HNSCC (KOSHIZUKA *et al.*, 2018). Em outro estudo, Okamoto *et al.* apresentaram dados que indicam uma função antitumoral dos pré-miR-150, miR-150-5p e miR-150-3p em células com expressão diminuída no carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC), quando comparados a tecidos normais e linhagens celulares ESCC (TE-8 e TE-1). Os autores demonstraram que ambos os filamentos do miRNA

miR-150-5p inibiam a migração e invasão de células cancerosas ESCC, indicando que tanto miR-150-5p como miR-142-3p tinham atividade antitumorigênica. Analisando a expressão dos miRNAs em câncer gástrico, Zhang *et al.* (2011) descreveu uma “assinatura” com baixa expressão de hsa-miR-375 e hsa-miR-142-5p em amostras de câncer gástrico com recorrência, quando comparadas com amostras sem recorrência. A partir destes dados, estes miRNAs foram selecionados como marcadores para verificar a progressão e o risco de recorrência do câncer.

Os estudos de perfis de expressão de miRNA no câncer de mama também tem fornecido informações sobre os processos de iniciação, progressão e manutenção do câncer (MATTIE *et al.*, 2006; HAFEZ *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2012). Os miRNAs no câncer de mama, por exemplo, a superexpressão dos miR-21, miR-155 e miR-200 e a expressão baixa dos miR-486-5p e miR-139-5p têm sido associados a todas as etapas ao longo da cascata metastática (KHOORN, 2010; RASK *et al.*, 2014; MEHRGOU *et al.*, 2017), tendo um grande potencial para serem biomarcadores diagnósticos e prognósticos, devido à sua extrema estabilidade e facilidade de detecção (ANDORFER *et al.*, 2011).

Vários miRNAs (miR-21, miR-10b, miR-155 e Let-7a) estão desregulados em soro de pacientes com câncer de mama em comparação com indivíduos saudáveis (ZHU *et al.*, 2009; VAN SCHOONEVELD *et al.*, 2012; KHALIGHFARD *et al.*, 2013). Estes miRNAs foram associados com subtipos específicos de câncer de mama, os miRNAs Let-7f, Let-7c e miR-155 foram associados com o luminal A e os miR-150 e miR-142-3p com o subtipo HER2-positivo (VAN SCHOONEVELD *et al.*, 2012), enquanto miR-153, miR-10b, miR-26a e miR-146a, com o subtipo triplo negativo (FKIH M'HAMED *et al.*, 2017).

Outro trabalho identificou nove miRNAs diferencialmente expressos (expressão alta: miR-361-5p; miR-26a-5p; miR-155-5p; miR-205-5p; miR-150-5p; miR-106b-5p; expressão baixa: miR-4734 e miR-424-3p) entre pacientes com e sem recidiva de câncer de mama. Isso permitiu desenvolver uma “assinatura” prognóstica para pacientes com câncer de mama *HER2*-positivo baseada em dois miRNAs (miR-4734 e miR-150-5p) (DU *et al.*, 2016).

Já no carcinoma ductal *in situ* (CDIS), no câncer de mama invasivo (CMI) e no câncer com invasão linfovascular, este estudo demonstrou expressão diferencial dos miRNAs miR-150, miR-126 e miR-155, sendo mais expressos em CMI em comparação com CDIS (SOON *et al.*, 2018).

Em pesquisa do nosso grupo, Sugita (2018), analisou o nível de expressão do miR-150-5p e sua função na atividade de tumores TN comparando pacientes afro-americanas e americanas brancas não-hispânicas. O miR-150-5p foi expresso mais elevada em tecidos tumorais do que em tecidos adjacentes não-tumorais e em tumores TNs comparados aos não-TNs. Além disso, foi observado que as afro-americanas apresentavam um maior nível de expressão de miR-150-5p em comparação com as americanas brancas não-hispânicas e que havia associação com fatores de mau prognóstico nas pacientes afro-americanas. Os estudos funcionais demonstraram a função oncogênica deste miRNA.

Ozawa *et al.* (2018) observaram que exossomos isolados de linhagem celular de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) (Ozawa *et al.*, 2018), são capazes de induzir proliferação e resistência a drogas nas células mamárias da linhagem não tumoral (MDA-MB-231) (Ozawa *et al.*, 2018), potencialmente mediadas por alterações na expressão de genes e miRNAs associados à proliferação, invasão e migração. Analisando a expressão de microvesículas extraídas de pacientes com câncer de mama triplo negativo, se destacaram os miRNAs 142-5p e 320a-3p, especialmente expressos nas microvesículas extraídas de pacientes *versus* controle e entre os subtipos luminal A e triplo negativo. O miRNA-142-5p apresentou uma alta expressão em pacientes com subtipo luminal A quando comparado com o triplo negativo. Além disso, o miRNA-142-5p teve uma alta expressão no câncer (Luminal A e triplo negativo) quando comparado com controle. Por outro lado, o miR-150-5p não apresentou diferença significativa quando comparado com controle, mas apresentou uma alta expressão em pacientes com subtipo luminal A quando comparado com subtipo triplo negativo. Outro dado interessante deste trabalho foi a sugestão de um painel de miRNAs para a diferenciação de pacientes com câncer de mama e indivíduos controle através da detecção da alta expressão do miRNA-142-5p, miR-320a-3p e miR-433b-5p, com uma acurácia de 0,84 (sensibilidade de 93,33%, especificidade de 68,75%), além da combinação da expressão dos miR-142-5p e miR-320a para distinguir o subgrupo Luminal A de TN. Foi verificado também que a expressão dos miRNAs foram associadas com fatores prognósticos, como a baixa expressão dos miR-142-5p e miR-320a com grau de tumor 3 ($p < 0,05$) e a alta expressão de miR-142-5p e miR-320a com tamanho de tumor $< 20\text{mm}$ ($p < 0,05$).

Diante do exposto fica evidente que a identificação de miRNAs como biomarcadores tem grande importância em vários tipos de câncer com grande potencial no diagnóstico, prognóstico e nos estudos de novos tratamentos.

JUSTIFICATIVA

A identificação acurada e precoce do câncer de mama aumenta de forma significativa as chances de sobrevida. O grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (UFPR) se dedica ao estudo do câncer há mais de 30 anos, principalmente o de mama. A partir de trabalhos realizados em nosso laboratório, estudos em microvesículas extraídas do sangue periférico de pacientes portadoras de câncer de mama demonstraram que as miRNAs 142-5p e 150-5p estão diferencialmente expressos em microvesículas extraídas de pacientes *versus* controles. Como o câncer de mama possui subtipos (luminal A e triplo negativo), foi desenvolvido este projeto para avaliar a expressão destes miRNAs em tecidos tumorais vs não tumoral e entre subtipos), desde que há controvérsia na literatura se há ou não correspondência entre a expressão de miRNAs e a expressão de genes de expressão. Esta análise de expressão se dará a partir de amostras de tecido fresco e *in silico* através do banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), também utilizaremos dados de expressão de miRNA-Seq através do “*Cancer Research Database*”. (OMCD). Paralelamente, em outros projetos do grupo, a expressão destes miRNAs está sendo avaliada em tecido livre, em plasma e soro de pacientes e controles, e entre subtipos do câncer de mama. Além disso, utilizaremos *in silico* do banco de dados TCGA e OMCD, os dados sobre a expressão diferencial dos miRNAs 142-5p e 150-5p em tecidos de mama serão comparados com os resultados obtidos neste estudo. Desta forma, ao final destes projetos, teremos um panorama completo da expressão dos mesmos em microvesículas, tecidos, plasma e soro de pacientes (individuais e coletivos) e controles.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

Contribuir na avaliação do potencial dos miRNAs 142-5p e 150-5p como biomarcadores no câncer de mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o nível de expressão dos miRNAs 142-5p e 150-5p no tecido mamário tumoral de portadoras de câncer de mama, subtipos Luminal A e triplo negativo

Avaliar o nível de expressão dos miRNAs 142-5p e 150-5p no tecido mamário adjacente não tumoral de portadoras de câncer de mama

Comparar os níveis de expressão do miR-142-5p e miR-150-5p publicados *online* pelos Bancos de Dados “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) e “*OncomiR Cancer Database*”. (OMCD).

Comparar os resultados com aqueles já obtidos na análise de exossomos para avaliar se o nível de expressão se mantém em diferentes amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado no Comitê de ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde com o CAAE: 19870319.3.0000.0102 em 17/10/2019. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CHARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras utilizadas no presente estudo consistem em tecidos tumoral e adjacente não tumoral de pacientes femininas, portadoras de câncer de mama. Os tecidos são rotineiramente coletados “a fresco” no momento da cirurgia, no Hospital Nossa Senhora das Graças, colocados em tubos contendo solução de *RNA/later* para preservação dos ácidos nucleicos, transferidos ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) onde são conservados em freezer -80°C até o momento da extração.

Foram selecionadas amostras provenientes de pacientes com carcinoma primário de mama de acordo com os seguintes critérios: 1) diagnóstico clínico e histológico positivo para a doença e classificação imunohistoquímica do tumor como luminal A, luminal B, HER2+ ou triplo-negativo; 2) serem provenientes de pacientes com no mínimo 18 anos de idade; 3) não apresentarem história prévia de câncer de mama ou outra síndrome de câncer hereditário; 4) estarem livres de tratamentos no momento da coleta. Para selecionar amostras do subtipo luminal A foram considerados as que possuíam marcadores de imunohistoquímica positivos para receptores de estrogênio (RE+) e de progesterona (RP+), e negativos para HER2 (HER2-) com o marcador de proliferação ki-67 menor que 14%. As amostras triplo negativas foram selecionadas pela negatividade dos três marcadores (RE-, RP- e HER2-) na imunohistoquímica.

Foram obtidas 73 amostras de tecido tumoral, sendo 49 caracterizadas como luminal A e 24 triplo-negativas, e 10 amostras de tecido adjacente não tumoral. As principais características estão descritas na Tabela 3.

Figura 3. DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SEPARADOS NOS SUBTIPO LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO

Dados clínicos e histopatológicos de câncer do subtipo Luminal A n= 49			Dados clínicos e histopatológicos de câncer do subtipo Triplo Negativo n= 49	
Gravidade	n	%	Grau tumoral	n
Invasor	29	59	Grau I	10
Non-invasor	4	8	Grau II	28
In situ	2	4	Grau III	4
Micro-invasor	4	8	Sem informação	7
Medular	7	14	Invasão em linfonodos auxiliares	n
	2	4	Presença	6
Sem informação	1	2	Ausência	37
Estádio do tumor	n	%	Sem informação	6
I	22	45	Idade	n
II	15	31	≤ 50	14
Sem informação	12	24	> 50	35

Características de câncer do subtipo Triplo negativo n= 24

Característica	n	%
Invasor	20	84
Não invasor	0	0
In situ	2	8
So invasor	0	0
Lobular	0	0
	2	8
Informação	0	0
Estadio do tumor	n	%
I	8	33
II	9	38
III	7	29

Grau tumoral

Grau tumoral	n
Grau I	1
Grau II	3
Grau III	13
Sem informação	7

Invasão em linfonodos auxiliares

Invasão em linfonodos auxiliares	n
Presença	9
Ausência	12
Sem informação	3

Idade

Idade	n
≤ 50	11
> 50	13

Fonte: o Autor (2019).

EXTRAÇÃO DE RNAs

As amostras de tecido tumoral e não tumoral foram submetidas a extração de RNA total, incluindo mRNAs e miRNAs, por meio do kit comercial *miRNeasy® Mini Kit (Qiagen)*. O *miRNeasy Mini Kit* combina a lise de amostras à guanidina e a purificação do RNA total baseada em membrana sílica. O Reagente de Lise QIAzol, incluído no kit, é uma solução monofásica de tiocianato de fenol e guanidina, que realiza a lise de tecidos, inibe RNases e também remove o DNA celular e proteínas do lisado por extração orgânica. As amostras de tecido são homogeneizadas em RNeasy Lysis Reagent QIAzol. Após adição de clorofórmio, o homogenato é separado em uma fase aquosa e outra orgânica por centrifugação. A fase aquosa superior onde se encontra o RNA total é extraída e é adicionado etanol para precipitação. A fase aquosa superior onde se encontra o RNA total é extraída e é adicionado etanol para precipitação. As amostras são então submetidas a uma série de lavagens apropriadas de ligação para todas as moléculas de RNA de 18 nucleotídeos para cima. A amostra é então adicionada a uma coluna de *spin RNeasy Mini*, onde o RNA total se liga à membrana e o fenol e outros contaminantes são eficientemente removidos. O RNA de alta qualidade é então eluído em água isenta de RNase. A quantificação foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 200 (*Thermo Fisher Scientific*), todas obtiveram concentração acima de 100 ng/ µL, e foram armazenadas em freezer -80° C.

OBTIÇÃO DE cDNA

A reação de retrotranscrição dos miRNAs foi realizada de acordo com o kit *TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem)*. As amostras foram diluídas em água livre de nuclease (DEPC) com concentração final de 10 ng/ µL e volume final de 10 µL em tubos de 0,5 mL. Foi adicionado 10 µL do *mix* com reagentes necessários (Água DEPC, *Reverse Transcription Buffer, MultiScribe Reverse Transcriptase, 5x RT Primer, RNase Inhibitor e 100mM dNTPS*), totalizando um volume final de 20 µL. Finalmente os tubos foram para o equipamento Mastercycler Gradient (Eppendorf) para amplificação dos fragmentos de cDNA por 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C e em espera a 4°C.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para a avaliação dos níveis de expressão dos miRNAs foram realizadas por meio de ensaios TaqMan® (*Applied Biosystems*), utilizando o equipamento *Viiia 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems™)*. Foram utilizadas três sondas de miRNA, sendo o RNU 48 utilizado como endógeno e o miR-155-3p como alvo.

miRNA-150-5p como alvo da pesquisa. No total 73 amostras de tecido tumoral (Luminal A e Triplo negativo) e 73 amostras de tecido adjacente foram utilizadas para realizar a RT-qPCR. Primeiramente as amostras de cDNA foram diluídas em 100 µL, adicionando 80 µL de água livre de nucleasse (DEPC) e 20 µL de amostra. Um *mix* para cada *primer* foi preparado contendo *Taqman* universal master mix (5 µL), e 0,5 µL de *Taqman Small RNA Assay* por amostra. Foram preparados três *mix* (TM-miR-142-5p; TM-miR-150-5p; TM-RNU48). Na placa de 96 poços foram adicionados 5 µL de cada *mix* por poço da placa. Em seguida, foram adicionados 4,5 µL de cDNA de cada amostra. Todas as reações foram realizadas em triplicata (FORERO *et al.*, 2019).

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS miRNAS NO TCGA

O TCGA é um projeto que faz parte do *National Cancer Institute* (NCI) e o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI). Trata-se de uma plataforma *online* gratuita com dados provenientes de pesquisas em câncer, incluindo dados de expressão gênica e sequenciamento de diferentes tipos de tumores. Utilizando o banco de dados do TCGA, analisamos dados oriundos de análise de expressão de miRNAs, utilizando *software* R no pacote edgeR e Limma para limpar, organizar, filtrar e normalizar os dados (LAW *et al.*, 2018).

Deve-se destacar que a classificação do câncer de mama utilizada pelo TCGA é a classificação molecular intrínseca, e não a imunoistoquímica como utilizada para os pacientes. Nesta classificação, os subgrupos são denominados luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, basal e *normal-like*. Procedemos à análise nos subtipos luminal A e basal, que se sobrepõem parcialmente ao subtipo triplo negativo analisado nos pacientes.

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS miRNAS NO OncomiR

O “*OncomiR Cancer Database*”. (OMCD). é um recurso on-line que explora os miRNAs de 30 tipos de câncer. O OMCD oferece ferramentas para as pesquisas identificarem e validarem miRNAs. Os dados do OMCD foram obtidos a partir do TCGA. Utilizando este recurso, conseguimos obter miRNA-Seq, e dados clínicos processados para quase todos os tipos de câncer em 30 tipos de câncer. Os dados são acessíveis para análise de sobrevivência e análise de agrupamento. (SARVER *et al.*, 2018). Nós realizamos a busca de associação dos miRNA-142-5p e miRNA-150-5p, e analisamos a expressão desses miRNAs em diferentes tipos de cânceres.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

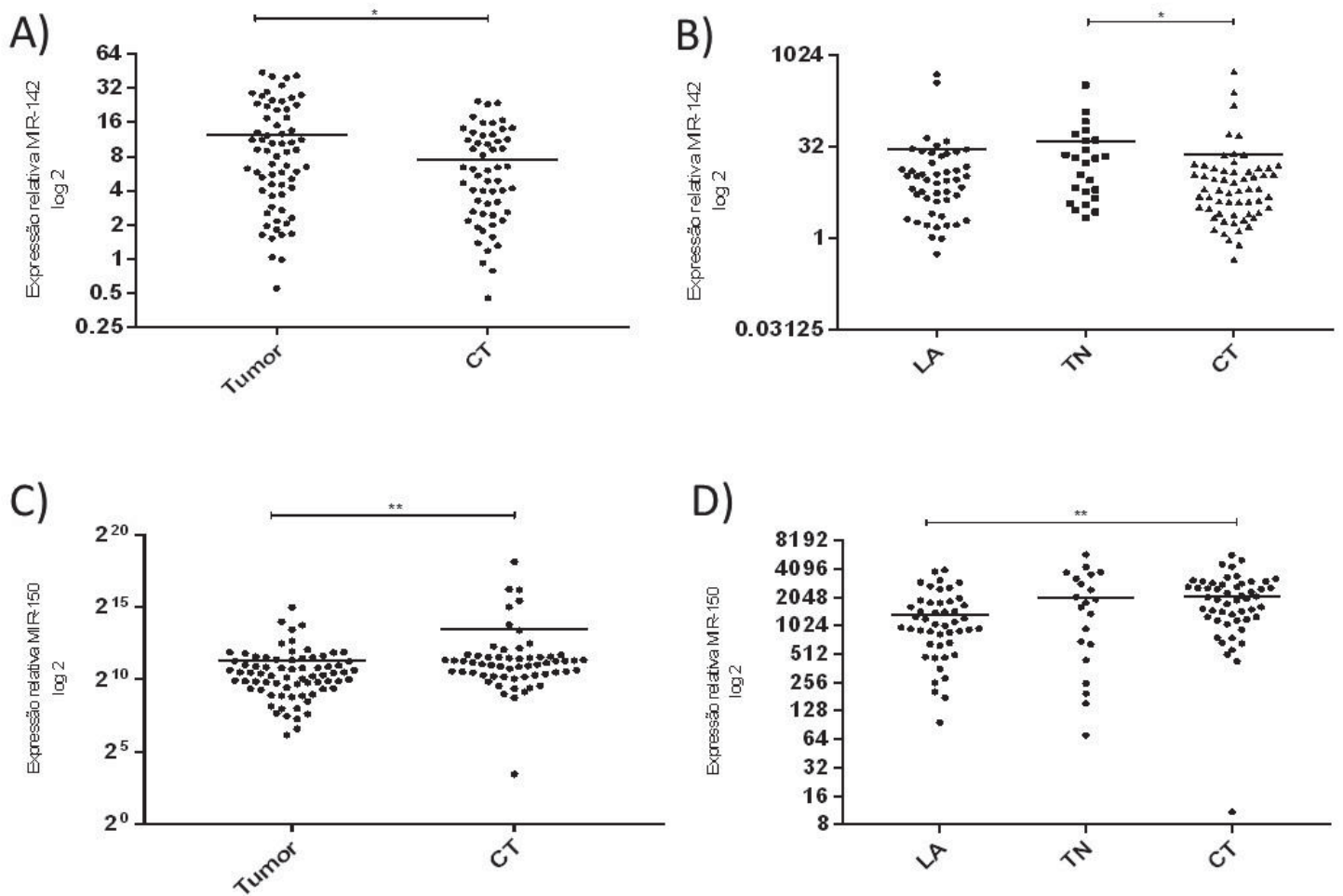
Os dados de RT-qPCR foram analisados inicialmente pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a obtenção dos dados relativos à expressão (PFAFFL *et al.*, 2001). O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ é útil quando muitos alvos e/ou amostras são testados e é semelhante ao da Curva Padrão Relativa, exceto por usar fórmulas aritméticas para alcançar o resultado para quantificação. Este método compara resultados de amostras experimentais com um calibrador e um normalizador. A quantidade de amostra utilizada para referência endógena e em relação ao calibrador, é dada pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Foram analisados todos os dados obtidos (incluindo dados clínico-patológicos) via *D'Agostino-Pearson omnibus* teste de normalidade *Shapiro-Wilk* para determinar se esses dados possuíam uma distribuição normal. Comprovação da normalidade dos dados, os testes não paramétricos foram utilizados. Foi utilizado, para comparação de dois grupos, o teste de *Mann – Whitney*, e para comparação de três ou mais parâmetros o teste de *Kruskal – Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. O método de *Rout* (Q = 1%), foi utilizado para identificar valores com expressão anormal (*outliers*). O valor de p ajustado <0,05 foi considerado significativo.

SULTADOS

EXPRESSÃO DOS miRNAs EM AMOSTRAS COM CÂNCER DE MAMA

O miR-142-5p foi analisado nas 73 amostras e nos controles apresentando nível de expressão significativamente mais alto no tecido tumoral quando comparado ao não-tumoral (CT) ($p < 0,05$) (Figura 4 A). As amostras tumorais foram analisadas quanto aos subtipos luminal A (LA, $n=49$) e triplo negativo (TN, $n=24$) e comparadas entre si e em relação aos controles. O miR-142-5p apresentou nível de expressão significativamente mais alto no subtipo TN comparado ao grupo de controle ($p < 0,05$) (Figura 4 B). O miR-150-5p foi analisado nas 73 amostras e demonstrou nível de expressão significativamente mais alto no tecido tumoral quando comparado ao não-tumoral (CT) ($p < 0,005$) (Figura 4 C). Na análise entre os subtipos, o miR-150-5p foi significativamente menos expresso em LA quando comparado ao CT ($p < 0,005$) (Figura 4 D).

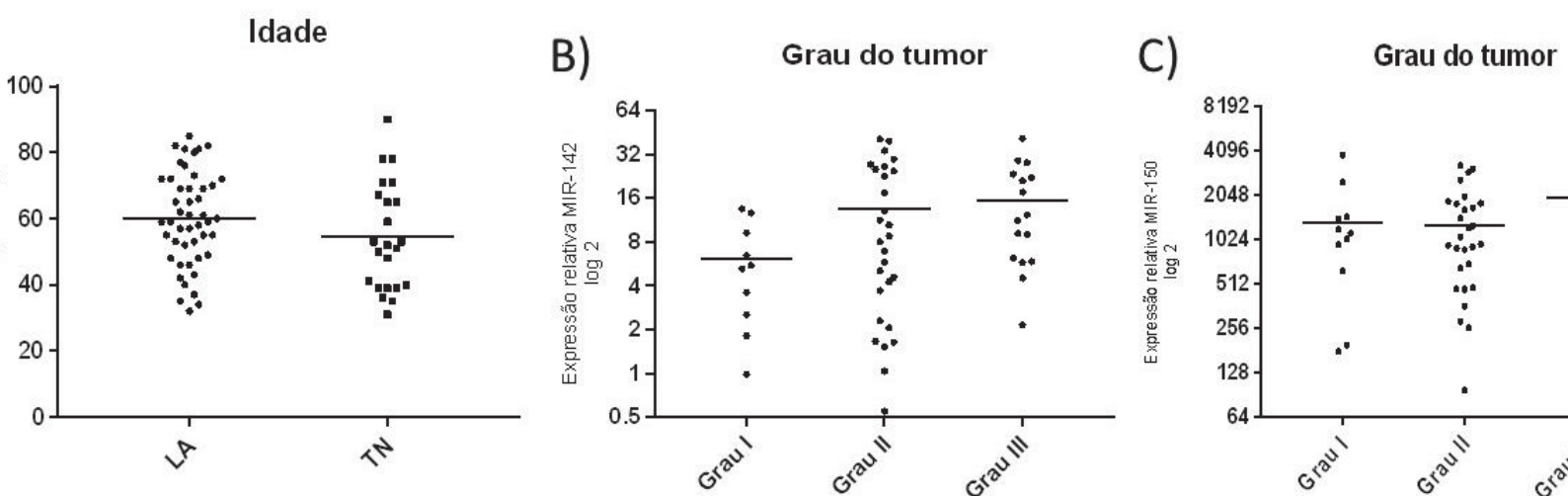


4. Expressão dos miRNAs em amostras de tecido tumoral e não-tumoral de acordo com o diagnóstico e subtipos. (A) Expressão relativa significativamente mais alto do miR-142-5p em tecido tumoral em comparação com controle (CT). (B) o nível de expressão relativa do miR-142-5p é significativamente mais alto em pacientes do subtipo triplo negativo (TN) em comparação com CT. (C) Expressão relativa significativamente mais alta do miR-150-5p em tecido tumoral em comparação com grupo CT. (D) miR-150-5p é menos expresso em pacientes do subtipo triplo negativo em comparação com grupo CT. Os valores de p foram considerados significativos quando, * p<0,05, ** p<0,005. O RNU 48 foi utilizado como controle interno. A linhagem celular BT-474 foi utilizada como calibrador em todas as placas. As análises foram realizadas com base na quantificação dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA.

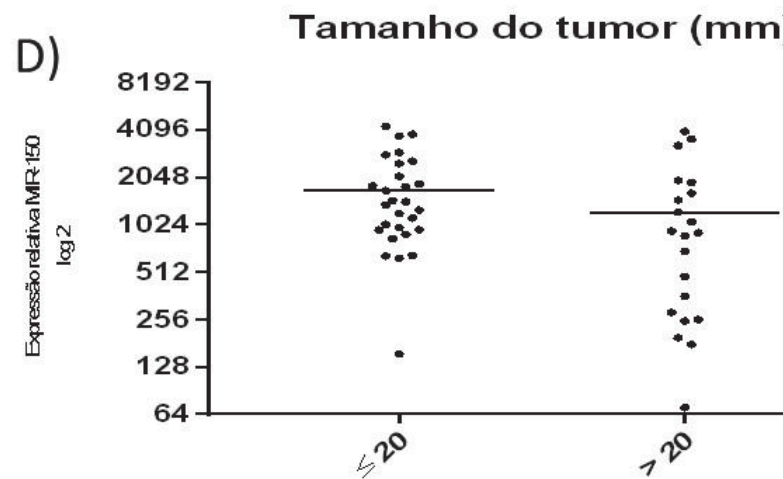
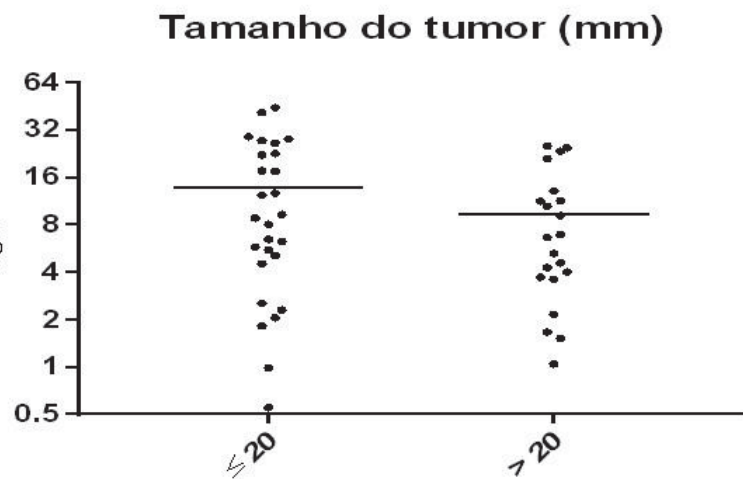
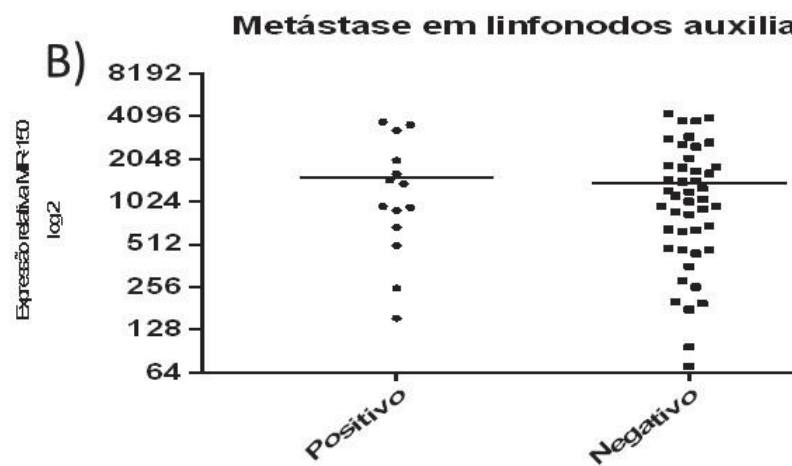
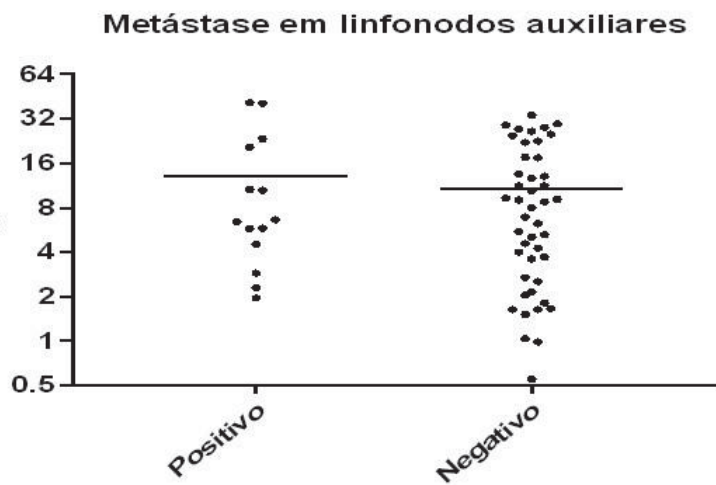
Os dados de expressão foram mensurados para os dois miRNAs (miR-142-5p e miR-150-5p) e associados aos parâmetros clínico-patológicos obtidos a partir dos laudos anatomo-patológicos dos pacientes (Tabela 3). As idades médias dos grupos pacientes e controles foi respectivamente de $58,19 \pm 14,95$ e $58,63 \pm 13,46$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

ativas na média das idades entre os grupos LA e TN (Figura 5 A). Não foi observada significância nas diferenças de expressão do miR-142-5p e miR-150-5p entre os graus de tumor —I, II e III— (Figura 5 B e C).



5. Análise da média de idade e graus dos tumores dos pacientes. A) Não foi observada diferença significativa entre as médias das idades nos grupos avaliados: Luminal A (LA) e triplo negativo (TN). B) Não houve alteração nos níveis de expressão dos miR-142-5p entre os graus de grau I, II e III. C) O miR-150-5p também não apresentou alteração nos níveis de expressão entre os tumores de grau I, II e III. ($p > 0.05$)

A média do nível de expressão do miR-142-5p (Figura 6 A) e no miR-150-5p (Figura 6 B) não apresentaram diferença significativa nas comparações entre pacientes com metástase em linfonodos axilares negativos e positivos. Quando realizada a análise de expressão diferencial do miR-142-5p (Figura 6 C) e do miR-150-5p (Figura 6 D) entre tumores menores e maiores (menores) quando comparadas com >20 mm, ambos miRNAs não apresentaram diferença significativa.



6. Comparação da expressão dos miRNAs com presença ou ausência de metástase em linfonodos auxiliares e comparação da expressão dos miRNAs ao tamanho do tumor. (A) Não houve significância na média do nível de expressão do miR-142-5p em pacientes com e sem metástase em linfonodos auxiliares. (B) O miR-150-5p também não apresentou diferença significativa nos seu nível de expressão em pacientes com e sem metástase em linfonodos auxiliares. (C) O miR-142-5p não apresentou diferença significativa nos níveis de expressão em tumores ≤ 20 quando comparados com tumores > 20 mm. (D) Não houve diferença significativa nos níveis de expressão do miR-150-5p em tumores menores que ≤ 20 comparados com tumores maiores que > 20 mm.

Os níveis de expressão do miR-142-5p foram significativamente mais altos em pacientes com tumor > 50 mm em comparação a pacientes com tumores ≤50 mm. (figura 7 A). O miR-150-5p também apresentou níveis de expressão significativamente mais altas em pacientes com > 50 mm em comparação a tumores ≤ 50mm (figura 7B).

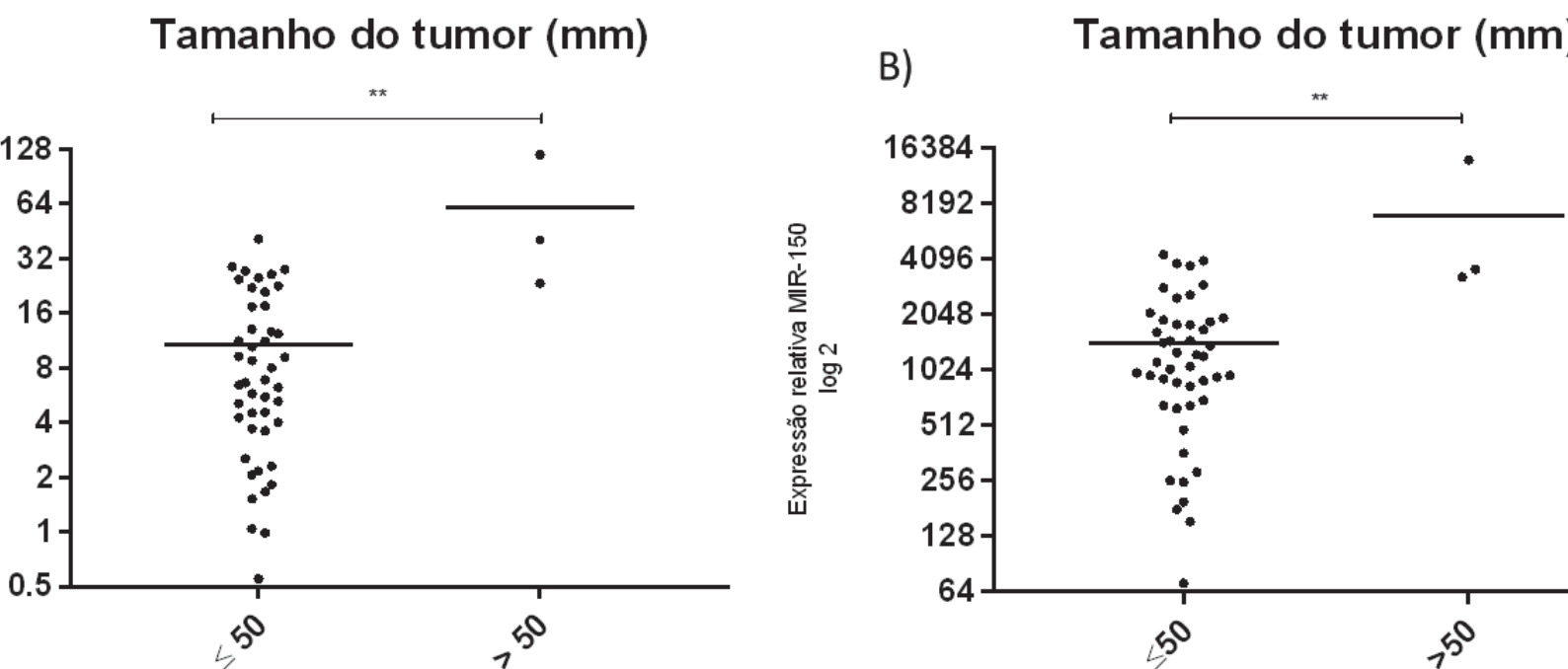


Figura 7. Análise de expressão diferencial do miR-142-5p e do miR-150-5p entre tumores de tamanhos ≤50 mm quando comparadas com >50 mm. Os valores de p foram considerados significativos quando, ** p<0,005..

EXPRESSÃO DO *miR142-5p* e *miR150-5p* NAS AMOSTRAS DO TCGA

A análise *in silico* foi realizada utilizando dados de expressão de 1207 pacientes portadoras de câncer de mama. Para a análise de expressão do miR-142-5p e miR-150-5p pelos subtipos LA e basal, obteve-se informação de 558 com câncer de mama do subtipo LA, 183 do subtipo basal e de 104 amostras de tecido não tumoral (ANT). Através desta análise *in silico*, foi verificado o nível de expressão dos miR-142-5p (tabela 4) e miR-150-5p (tabela 5). Foi realizada uma comparação entre: Basal *versus* ANT, LA *versus* ANT e Basal *versus* LA.

LA 4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO *MIR142-5p* ENTRE OS SUBTIPOS REALIZADA COM DADOS DO TCGA.

miR-142-5p	LA vs ANT		
	FC/log2	PValue	FDR
	0,982	2,24E-14	5,78E-14
miR-142-5p	Basal vs ANT		
	FC/log2	PValue	FDR
	1,778	141E-21	4,31E-21
miR-142-5p	Basal vs LA		
	FC/log2	PValue	FDR
	0,14	9,61E-09	1,90E-08

Fonte: o Autor (2019).

se *in silico* em diferentes comparações. Superexpresso em LA comparado ao ANT; Superexpresso em Basal comparado ao ANT e no Basal comparado ao LA Legenda: ANT (tecido não tumoral adjacente), LA (luminal A), FC/log2 (*log fold change*), PValue (*p-value*) e FDR (*false discovery rate*).

LA 5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO *MIR150-5p* ENTRE OS SUBTIPOS REALIZADA COM DADOS DO TCGA.

miR-150-5p	LA vs ANT		
	FC/log2	PValue	FDR
	-0,922	4,40E-08	8,49E-08
miR-150-5p	Basal vs ANT		
	FC/log2	PValue	FDR
	-0,553	0,0092273824	0,011086752
miR-150-5p	Basal vs LA		
	FC/log2	PValue	FDR
	-0,185	0,227784847	0,258078484

Fonte: o Autor (2019).

se *in silico* em diferentes comparações. Menos expresso em LA comparado ao ANT; menos expresso em Basal comparado ao ANT; mais expresso no Basal comparado ao LA Legenda: ANT (tecido não tumoral adjacente), LA (luminal A), FC/log2 (*log fold change*), *PValue* (valor de *p*), FDR (*false discovery rate*).

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO *miR142-5p* e *miR150-5p* NAS AMOSTRAS DO OncomiR

O “*OncomiR Cancer Database*” (OMCD), permite análises genômicas comparativas e sistemáticas dos dados de expressão de miRNA derivados de mais de 9500 amostras de tecidos de pacientes com câncer disponíveis no *The Cancer Research Program Genome Atlas* (TCGA).

Essa análise *in silico* foi realizada no OMCD utilizando dados de miRNA-seq do TCGA de pacientes com diversos tipos de cânceres. As análises foram realizadas para identificar a expressão média do miR-142-5p e do miR-150-5p em diferentes tipos de cânceres, comparando tecido tumoral com tecidos não-tumorais. Como resultado o miR-142-5p apresentou alta expressão no câncer de mama comparados ao tecido não tumoral (Tabela 6), ao contrário do miR-150-5p apresentou nível de expressão mais alto no grupo tecido não-tumoral comparado com tecido tumoral (Tabela 7).

TABELA 6. TIPOS DE CÂNCER COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO HSA-miR-142-5p

miRNA	Tipo de câncer	Teste t valor de p	Teste t- FDR	Aumento de expressão:	Tumor Expressão Média (Log2)	Não-tumoral (NT) Expressão Média (Log2)
miR-142-5p	BRCA	9.10e-10	4.05e-09	Tumor	5.69	4.55
miR-142-5p	COAD	4.50e-05	3.45e-04	Tumor	6.07	0.28
miR-142-5p	KIRC	3.77e-16	3.07e-15	Tumor	5.79	3.66
miR-142-5p	LIHC	1.24e-09	1.68e-08	NT	5.22	6.84
miR-142-5p	PRAD	1.15e-05	5.28e-05	Tumor	4.42	3.63
miR-142-5p	STAD	2.22e-05	9.14e-05	Tumor	6.61	4.77
miR-142-5p	THCA	7.06e-06	2.69e-05	NT	5.04	5.96

Legenda: BRCA: carcinoma invasivo de mama; COAD: adenocarcinoma do cólon; KIRC: carcinoma renal de células claras; LIHC: carcinoma de fígado hepatocelular; PRAD: adenocarcinoma da próstata; STAD: adenocarcinoma de estômago; THCA: carcinoma de tireoide.

TABELA 7. TIPOS DE CÂNCER COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO HSA-miR-150-5p

miRNA	Tipo de câncer	Teste t valor de p	Teste t-FDR	Aumento de expressão:	Tumor Expressão Média (Log2)	Não-tumoral (NT) Expressão Média (Log2)
miR-150-5p	BRCA	1.94e-03	4.27e-03	NT	9.05	9.68
miR-150-5p	COAD	3.33e-05	2.86e-04	NT	8.02	12.64
miR-150-5p	ESCA	4.51e-02	1.34e-01	NT	8.72	8.10
miR-150-5p	HNSC	9.21e-03	2.06e-02	NT	8.72	9.47
miR-150-5p	KICH	3.05e-02	5.83e-02	NT	7.08	7.86
miR-150-5p	KIRC	9.25e-07	2.57e-06	Tumor	8.59	7.48
miR-150-5p	LIHC	6.51e-07	4.10e-06	NT	7.72	9.14

Tabela 7. BRCA: carcinoma invasivo da mama; COAD: adenocarcinoma do cólon; ESCA: carcinoma de esôfago; HNSC: carcinoma de células de cabeça e pescoço; KICH: cromóforo renal; KIRC: carcinoma renal de células claras; LIHC: carcinoma hepatocelular.

DISCUSSÃO

O câncer de mama é o que mais afeta mulheres em todo o mundo e o segundo mais frequente no Brasil (OMS, 2020), e dessa forma, investigar novos métodos de diagnósticos e tratamento é de vital importância. A classificação de mama em subtipos é essencial para definição do tratamento e uma série de novos biomarcadores vêm sendo descobertos para melhor caracterizar esta doença (e.g. WANG *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2016; FKI M'HAMED *et al.*, 2017; ALDI, GHORBAN, 2018; WANG *et al.*, 2019; OZAWA *et al.*, 2020).

Uma importante ferramenta na busca de novos biomarcadores é o estudo dos miRNAs. Estes têm como função a manutenção da homeostase da célula. Mas por serem reguladores gênicos importantes, alterações de sua expressão ou dos próprios miRNAs podem contribuir com o desenvolvimento de doenças. Estudos sugerem que miRNAs podem regular a expressão de um amplo espectro de genes, resultando em processos celulares alterados, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose (CHEN, RAJEWSKY, 2007; Tese de doutorado, SUGITA, 2018; MA *et al.*, 2018, 2020). Os miRNAs podem atuar promovendo o desenvolvimento e progressão de tumores, o que os torna um fator da tumorigênese (IORIO *et al.*, 2005; LAWRIE *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2012; REZAKHANI, SVORONOS *et al.*, 2016). Neste trabalho, avaliamos o nível de expressão em tecido tumoral, não-tumoral e *in vitro* de miRNAs, discutidos a seguir.

7.1. miR-142-5p

O miR-142-5p vem sendo estudado em vários tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2011; LIU L. *et al.*, 2017; LIU S. *et al.*, 2018), porém sua relação com o câncer de mama ainda está sendo elucidada. De acordo com a ferramenta de bioinformática TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/), é previsto que o miR-142-5p contém um total de 950 transcritos com sítios de ligação conservados para este miRNA, com 1028 regiões conservadas e 715 locais pouco conservadas — vale lembrar que essas previsões são previstas e incluem alguns falsos positivos —. Um exemplo de alvo é a fosfatase homóloga à tensina (PTEN). Foi demonstrado que os níveis de expressão de miR-142-5p e PTEN foram associados positivamente e negativamente, ao tamanho do tumor e à metástase do paciente (XU, WANG, 2018). Outro estudo observou que o miR-142-5p pode atuar como um regulador negativo da via de sinalização do TGF- β visando o SMAD3. — o TGF- β é uma citocina, exerce seu efeito na expressão gênica através dos fatores de transcrição conhecidos como proteínas Smad. Neste estudo o miR-142-5p promoveu o crescimento e a sobrevivência de células cancerígenas humanas, suprimindo a sinalização de TGF- β (MA *et al.*, 2016).

No câncer de mama foi relatada a superexpressão do miR-142-5p no tumor em comparação com tecido não tumoral (E *et al.*, 2014; XU, WANG, 2018), e também em exossomos (OZAWA *et al.*, 2020). Este mesmo resultado foi observado neste trabalho, quando avaliamos a expressão do miR-142-5p no tecido tumoral de 73 portadoras de câncer de mama e 60 tecidos adjacentes não-tumorais.

A partir de estudos de expressão genica e estudos funcionais, sugeriu-se que este miRNA possui um potencial oncofisiológico no câncer de mama (XU, WANG, 2018; YU *et al.*, 2019; OZAWA *et al.*, 2020).

Demonstrou-se na análise comparativa entre controles e subtipos luminal A (LA) e triplo negativo (TN), que o miR-142-5p não apresentou alta expressão no subtipo TN quando comparado ao grupo CT, não havendo diferença de expressão entre LA ou entre LA e CT. Esse resultado é similar ao encontrado na análise de expressão do miR-142-5p em linhagens de câncer de mama — incluindo MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-451, MDA-MB-453 e HCC1937 — em comparação com a linhagem normal HS578Bst (YU *et al.*, 2019). Em vesículas extracelulares extraídas de soro de pacientes com câncer de mama, o miR-142-5p apresentou nível mais alto de expressão no subtipo LA, tanto na comparação com TN quanto com CT (OZAWA *et al.*, 2020), ou seja, houve correspondência entre nosso estudo e o de Ozawa *et al.* (2020) sobre a expressão geral tumor (LA+TN) *versus* CT. Isso pode ser decorrente desse estudo ter sido conduzido em exossomos, já que os miRNAs contidos nas vesículas extracelulares não necessariamente refletem os miRNAs encontrados no tecido tumoral (WANG *et al.*, 2012, OZAWA *et al.*, 2020). Uma hipótese para esta diferença nos níveis de expressão, é que as amostras de vesículas possam ser “contaminadas” com outros tipos celulares que permanecem mesmo após a dissecação manual das amostras. Assim, os miRNAs de vesículas extracelulares talvez possuam maior poder de diferenciar os subtipos. Porém, mais estudos devem corroborar esta hipótese.

Em uma investigação sobre a associação da expressão de miR-142-5p com características clínico-patológicas em pacientes com câncer de mama, a análise realizada neste estudo mostrou que não foram observadas diferenças significativas na idade das idades entre os grupos LA e TN. Esse resultado corrobora os dados de Xu e Wang (2018), onde não foi observada associação significativa entre os níveis de expressão de miR-142-5p e a idade de pacientes com câncer de mama.

O parâmetro de grau do tumor foi analisado e não foi observada significância nas diferenças dos níveis de expressão de miR-142-5p entre os graus de tumor (I, II e III). Isto difere dos resultados da análise em vesículas extracelulares de pacientes com câncer de mama, em que pacientes com grau I apresentaram maior expressão do miR-142-5p comparado com grau III (OZAWA *et al.*, 2020).

No estudo de Wang *et al.* (2014), os níveis de expressão de miR-142-5p foram mais altos em pacientes com câncer de mama com metástase no linfonodo (LN) em comparação com pacientes sem metástase linfonodal (NLN). Além disso, por meio de microarray/miRNA, verificou a expressão de miRNAs em pacientes com câncer de mama primário com LN e sem LN. Entre os miRNAs estudados, o miR-142-5p estava superexpresso no grupo LN quando comparado com o grupo NLN (WANG *et al.*, 2014). Contudo, análises de bioinformática do banco de dados do OMCD indicaram que a superexpressão

miR-142-5p está associado a metástase linfonodal de células de mama cancerosas (YU *et al.*, 2019). No presente trabalho não foi observada diferença significativa na expressão do miR-142-5p entre pacientes com metástase em linfonodos negativos e positivos. Esses dados não estão de acordo com estudos anteriores no câncer de mama (WANG *et al.*, 2019).

A classificação TNM determina que o tumor é considerado T1 quando ≤ 20 mm (ELSTON, ELLIS, & DRAEE *et al.*, 2012) e utilizamos este parâmetro para nossa análise. Os resultados da análise de expressão diferencial do miR-142-5p entre tumores ≤ 20 mm quando comparadas com >20 mm, não apresentou diferença significativa. Xu *et al.* (2019) apresentaram dados semelhantes, porém considerando dois parâmetros: tumores menores que 50mm e sem metástases e tumores maiores ou iguais a 50mm e com metástases. Os níveis de expressão do miR-142-5p foram significativamente mais altos em pacientes com tumor <50 mm e pacientes sem metástase, em comparação a pacientes com tumor ≥ 50 mm que exibiram metástases. Tomando este valor de tamanho tumoral como parâmetro (≤ 50 mm e > 50 mm), foi realizada a análise de expressão diferencial do miR-142-5p, os níveis de expressão se tornam significativamente mais altos em pacientes com > 50 mm em comparação a tumores ≤ 50 mm (Figura 7A), demonstrando que talvez este miRNA seja mais sensível em diferenciar tumores de graus mais elevados pela classificação TNM.

Através da análise de expressão *in silico* utilizando dados do TCGA de 869 pacientes, Yu *et al.* (2019) identificou que o miR-142-5p estava superexpresso no tecido de câncer de mama em comparação com o tecido adjacente não tumoral. Além disso, em uma análise de RNA-seq, foi verificado que o miR-142-5p estava mais expresso no controle de tecido não tumoral comparado com subtipo TN (OZAWA *et al.*, 2020). Em nossa análise *in silico* realizada no TCGA, utilizamos dados de expressão diferencial de miRNAs em tecido tumoral comparados com tecidos não tumoral. Identificamos a expressão diferencial do miR-142-5p em 741 pacientes com câncer de mama, e verificamos expressão aumentada nos tumores (LA+basal) em comparação com o tecido não tumoral adjacente (ANT), subtipos basal *versus* ANT, LA *versus* ANT e no basal *versus* LA. Outra análise realizada com os dados do banco OncomiR (OMCD), em que o miR-142-5p também apareceu superexpresso no tecido tumoral comparado com tecido normal.

Importante ressaltar que a presença de um maior nível de expressão do miR-142-5p em tumores do que em tecidos normais, foi o único resultado consistente em todas as análises realizadas neste e em outros trabalhos (tanto *in vivo* como e *in silico*), reforçando o potencial desse miRNA como um possível biomarcador para diagnóstico e prognóstico. A consistência de resultados entre subtipos e entre parâmetros de prognóstico demonstra a clara necessidade de estudos com maior número de amostras e com melhor padronização de métodos e coleta de dados.

7.2. miR-150-5p

O miR-150-5p foi descrito como expresso diferencialmente em vários tipos de câncer humano (WATANABE *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2013; WUERKENBIEKE *et al.*, 2015; OKATO *et al.*, 2017; Tese de doutorado, SUGITA, 2018; KOSHIZUKA *et al.*, 2018). A ferramenta de bioinformática Target Scan (http://www.targetscan.org/vert_72/), tem indicado que o miR-150-5p contém um total de 356 transcritos com alvos conservados para este miRNA, contendo 153 alvos conservados e 407 alvos pouco conservados. Tang *et al.* (2018), observou que o *miR-150* estava menos regulado em células tumorais TNBC em comparação com os tecidos mamários normais adjacentes correspondentes e associado com a diminuição das metástases linfonodais. A expressão do *miR-150* suprimiu a migração celular TNBC e a metástase in vivo. Foi demonstrado que o *miR-150* regula negativamente o HMGA2, direcionando diretamente a migração celular. Além disso, a supressão da migração celular causada pelo *miR-150* é diminuída pela super expressão de HMGA2. Concluindo que o *miR-150* inibe a migração de células TNBC pela regulação negativa do HMGA2.

O miR-150-5p pode atuar inibindo a proliferação, migração e invasão de células cancerosas através de diferentes mecanismos (WATANABE *et al.*, 2011; WUERKENBIEKE *et al.*, 2015; Tese de doutorado, SUGITA, 2018), ou promovendo a proliferação e metástase de células cancerígenas (WU *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2015). Se o miR-150-5p promover ou inibir a progressão do tumor, depende principalmente do tipo de câncer, pois este miRNA possui funções diferentes em diferentes tipos de câncer (CROCE, 2009).

No presente estudo, a expressão do miR-150-5p foi significativamente mais baixa no tecido tumoral comparado ao tecido adjacente (CT). Na análise de subtipos, comparando os grupos LA, TN e controle, o subtipo TN foi significativamente menos expresso quando comparado ao grupo controle, não havendo diferença nas comparações entre LA e TN e TN *versus* CT.

Esses dados são diferentes dos encontrados por outros trabalhos que descrevem a expressão do miR-150-5p elevada no tecido de câncer de mama em comparação com amostras de tecidos saudáveis adjacentes. (LU *et al.*, 2019; SUGITA, 2019).

No câncer de mama do subtipo TN, o miR-150-5p tem exibido superexpressão quando comparado ao tecido adjacente (TSAI *et al.*, 2018) e quando comparado a outros subtipos não triplo negativos (Tese de doutorado, SUGITA, 2018). Sugita (2016), realizou a comparação de expressão de miRNAs diferencialmente expressos de pacientes TN e não-TN em mulheres afro-americanas e brancas não-hispânicas. Entre os resultados, 15 miRNAs diferencialmente expressos foram selecionados com maior *fold change* com valores estatisticamente significativos, sendo que o miR-150-5p estava superexpresso em TN comparado a não-TN e em afro-americanas comparado a brancas não-hispânicas.

comparadas com americanas brancas não-hispânicas. No presente trabalho, a análise de RT-qPCR não apresentou diferenças estatísticas na expressão do miR-150-5p na comparação entre o subtipo TN e o LA, único subtipo comparado.

No entanto, Tang *et al.* (2018), identificaram baixa expressão do miR-150-5p nos tecidos de câncer de mama do subtipo TN comparados com tecidos adjacentes, assim como nas linhagens celulares TN do que na linhagem celular de células de mama não tumoral —. Outros estudos com linhagens celulares foram divergentes do nosso, demonstrando que o nível de expressão do miR-150-5p aumentou significativamente em várias linhagens celulares de mama (MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231 e MDA-MB-157) em comparação com a linhagem de célula de mama não tumoral MCF10A (LU *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019).

Baseado nos resultados obtidos nesse estudo e os resultados encontrados na literatura, percebe-se que o miR-150-5p aparece com diferentes níveis de expressão no câncer de mama quando comparado ao tecido não tumoral em linhagens celulares, não havendo um consenso na literatura. Talvez estes resultados conflitantes se devam aos diferentes protocolos utilizados nas investigações, e deva-se discutir uma maior padronização no estudo dos miRNAs.

Os valores dos dados *in silico* sobre a expressão do miR-150-5p a partir do TCGA, demonstraram que o miR-150-5p é menos expresso em tecido tumoral quando comparado ao tecido não tumoral, resultado similar ao de nossas análises em tecido e divergente daquele obtido em microvesículas, em que não foi detectada diferença estatisticamente significativa. No presente trabalho, houve diferença significativa nas comparações entre o subtipo LA *versus* o tecido não-tumoral e o nível de expressão no tumor, similarmente ao que descrevemos na nossa análise em tecido. Já na comparação do subtipo basal *versus* ANT e basal *versus* LA, não houve poder estatístico para uma análise segura. Na análise por RNA-seq, ao investigar a expressão diferencial de miR-150-5p extraído de vesículas extracelulares, foi observado maior expressão do miR-150-5p no LA comparado ao subtipo TN (OZAWA *et al.*, 2020).

Na análise *in silico* utilizando OMCD, a expressão média do miR-150-5p foi menor no tecido tumoral do que no tecido não tumoral quando comparado com tecido não-tumoral. Este dado é coincidente com os resultados de qPCR apresentados anteriormente nesse estudo e com a análise do TCGA. Além disso, na análise de qPCR a expressão do miR-150-5p foi estatisticamente menor nos grupos LA em comparação ao grupo CT, resultado que também está de acordo com os resultados na análise *in silico* do TCGA. Dados de RNAseq de vesículas extracelulares de pacientes com câncer de mama não demonstram diferença significativa no nível de expressão do miR-150-5p em CT em comparação com o LA (OZAWA *et al.*, 2020). Em resumo, estas análises mostram uma concordância entre as análises por qPCR em tecidos tumorais e a análise *in silico*, mas é divergente da análise realizada em microvesículas.

Analisando os parâmetros clínico-patológicos com a expressão do miR-150-5p, não obtivemos valores significativos para o parâmetro que avalia a diferença nos níveis de expressão do miR-150-5p em diferentes graus do tumor (graus I, II e III). Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão. Quando estudados os níveis de expressão do miR-150-5p em pacientes com e sem metástase nos linfonodos, não houve diferenças significativas na expressão do miRNA nesses parâmetros.

metástase em linfonodos quando comparados com pacientes sem metástase. Porém, dados da literatura sugerem que miR-150 pode regular negativamente a metástase de células de câncer de mama no subtipo TN (TANG *et al.*, 2018). Na análise, outro parâmetro que não obteve diferença significativa foi nos níveis de expressão entre tumores ≤ 20 mm comparados com aqueles > 20 mm. No entanto, autores que utilizaram 50mm como ponto de corte, observaram diferença significativa nos níveis de expressão, mais alta em tumores maiores que 50mm. Assim como já discutido acima para o miR-155, realizamos esta mesma análise modificando nosso parâmetro e obtivemos diferença significativa também para o miR-150 (Figura 7B), apresentando mais expressão em tumores > 50 mm comparados a ≤ 50 mm.

Os resultados apresentados nesse estudo estão de acordo com outros trabalhos que realizaram essa análise de expressão diferencial do miR-150-5p (TANG *et al.*, 2018), mas também não corresponde a resultados encontrados por outros autores (TSAI *et al.*, 2018; OZAWA *et al.*, 2020). O nível de expressão do miR-150-5p no câncer de mama parece ter sido alterado por fatores que alteram seus valores. Em resumo, valores de expressão diferentes foram encontrados em diferentes estudos (TANG *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2018; LU, GUO, QIAN *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019; OZAWA *et al.*, 2020) e em todos esse miRNA apresentou-se menos expresso em tumor quando comparados ao tecido não tumoral, apontando para o miRNA como um candidato a marcador de diagnóstico mas não de prognóstico. De fato, esse miRNA está influenciando o desenvolvimento do câncer de mama, no entanto trabalhos de diferentes autores ainda estão em conflito sobre seu nível de expressão. Portanto, mais estudos são necessários para reforçar seu potencial como biomarcador para prognóstico.

CONCLUSÕES

Verificou-se que o nível de expressão dos miRNAs 142-5p está mais elevado no tecido mamário tumoral de po de câncer de mama comparado com tecido não tumoral adjacente. Já na análise de expressão do tecido não tu nos subtipos Luminal A e triplo negativo, os resultados indicam que o miR-142-5p é mais expresso no subtip negativo comparado com o tecido não-tumoral. Esses resultados foram reforçados pela análise dos ní expressão *in silico* utilizando os bancos de dados “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) e “OncomiR Cancer Da (OMCD).

A expressão do miR-142-5p corroborou os resultados obtidos na biópsia líquida — análise em microvesí contribuindo, assim, na avaliação deste como potencial biomarcador para diagnóstico.

O nível de expressão do miR-150-5p obteve valores de expressão menores no tecido mamário tumoral de po de câncer de mama comparado com tecido não tumoral adjacente. Na análise de expressão tecido não tumor subtipos Luminal A e triplo negativo, a expressão observada foi menor no subtipo LA do que no tecido não Esse achado é correspondente ao encontrado na análise *in silico* do TCGA e OMCD, porém divergente dos predominantemente na literatura.

Conclui-se que o miR-150-5p tem resultados bastante divergentes na literatura, necessitando de mais estudos padronização para conclusões mais concretas sobre sua função e possível papel de biomarcador no câncer de

PERSPECTIVAS

A expressão desses miRNAs está sendo avaliada na forma livre, em plasma e soro de pacientes e controles, nos subtipos do câncer de mama. Além das análises de expressão, estudos funcionais também serão realizados. Esperamos que os resultados destes experimentos, possamos contribuir com um melhor entendimento da função destes miRNAs no câncer de mama, nos seus subtipos e colaborar para o estabelecimento destes como potenciais biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- ATA DESAI, K. A. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. **Hereditary Genetics**, 2012. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/triple-negative-breast-cancer-an-overview-2161-1041.S2-001.php?aid=13213>>. Acesso em: 9/3/2020.
- RZAIE, S.; BAGHERZADEH, M.; AKBARI, M. R. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 95, n. 6, p. 643–660, 2019.
- FERREIRA, C. A.; NECELA, B. M.; THOMPSON, E. A.; PEREZ, E. A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 6, p. 313–319, 2011.
- TOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- YO, J. D.; CHEVILLET, J. R.; KROH, E. M.; *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 12, p. 5003–5008, 2011.
- ELS, C. L.; TSONGALIS, G. J. MicroRNAs: Novel Biomarkers for Human Cancer. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 812–821, 2009.
- L, V.; REEVES, G. Childbearing, oral contraceptive use, and breast cancer. **The Lancet**, v. 341, n. 8852, p. 1102–1103, 1993.
- KARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. **Primary Pathology**, v. 51, n. 4, p. 759–774, 2014.
- TACHARYYA, M.; NATH, J.; BANDYOPADHYAY, S. MicroRNA signatures highlight new breast cancer subtypes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 2, p. 192–198, 2015.
- KIRON, C.; GOLDSTEIN, L. D.; THORNE, N. P.; *et al.* MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies novel markers of tumor subtype. **Genome Biology**, v. 8, n. 10, p. R214, 2007.
- M, H. J. G.; RICHARDSON, W. W. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer: A Study of 1409 Cases of which 359 have been Followed for 15 Years. **British Journal of Cancer**, v. 11, n. 3, p. 359–377, 1957.
- F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- , G. A.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M.; *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent mutations and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15524–15529, 2002.
- M.; HOU, D.; LIANG, H.; *et al.* miR-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting the p53 signalling inhibitor 1. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 5, p. 1013–1024, 2014.
- NE, N. E.; LOSTUMBO, L.; WALLACE, J.; KO, H. Risk-reducing mastectomy for the prevention of primary breast cancer. (Cochrane Breast Cancer Group, Org.) **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2018. Disponível em: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD002748.pub4>>. Acesso em: 9/3/2020.

, J.; TIAN, W.; CAI, H.; HE, H.; DENG, Y. Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 2527–2534, 2012.

, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. **Nature Reviews. Genetics**, v. 8, n. 2, p. 93–103, 2007.

, M.; ZHAO, H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. **Human Genomics**, n. 1, p. 34, 2019.

, W.; HOFFMANN, A. D.; LIU, H.; LIU, X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. **NPJ precision oncology**, v. 2, n. 1, p. 4, 2018.

MER, R.; ARANDA-LÓPEZ, I.; ALBANELL, J.; *et al.* Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, p. 815–826, 2018.

E, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 1, p. 14, 2009.

E, C. M.; CALIN, G. A. miRNAs, Cancer, and Stem Cell Division. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 6–7, 2005.

IX PF. Tumor, node and metastasis (TNM). *bull inst. Nat hyg (paris)* 7:743, 1952.

O, B. J. Estrogen receptors and human disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 561–570, 2000.

CHEK, S. M. Association of Risk-Reducing Surgery in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers With Cancer Risk and Mortality. **JAMA**, v. 304, n. 9, p. 967, 2010.

; YUAN, P.; ZHAO, Z. T.; *et al.* A miRNA-based signature predicts development of disease recurrence in HER2 positive breast cancer after adjuvant trastuzumab-based treatment. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33825, 2016.

HOORN, D. M. MicroRNAs and Metastasis: Little RNAs Go a Long Way. **Cancer Research**, v. 70, n. 16, p. 6401–6406, 2010.

BIENE, N.; SAARENHEIMO, J.; JEKUNEN, A. Potential of Liquid Biopsies for Breast Cancer Screening, Diagnosis, and Response to Treatment. **Oncology**, v. 96, n. 3, p. 115–124, 2019.

ON, C. W.; ELLIS, I. O. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403–410, 1991.

J, A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. In: A. B. Engin; A. Engin (Orgs.); **Obesity and Metabolic Syndrome**. v. 960, p.571–606, 2017. Cham: Springer International Publishing. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5_25. Acesso em: 9/3/2020.

ES, P.; BOSCH, A.; ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

ELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. OncomiRs — microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 225–237, 2006.

ER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray and gene, v. 24, n. 29, p. 4660–4671, 2005.

M'HAMED, I.; PRIVAT, M.; TRIMECHE, M.; *et al.* miR-10b, miR-26a, miR-146a And miR-153 Expression in Triple Negative Vs Non Triple Negative Breast Cancer: Potential Biomarkers. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 4, p. 2017.

RO, D. A .; GONZÁLEZ-GIRALDO, Y .; CASTRO-VEGA, L. J .; BARRETO, G. E. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*, Vol. 67, n. 4, p. 192–199, 2019.

HIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A. S.; *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: insights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.

HIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: insights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

SENS, N.; NAKAGAWA, S.; SUN, X.; HOSHIDA, Y. Cancer biomarker discovery and validation. **Translational Cancer Research**, v. 4, n. 3, p. 256–269, 2015.

A, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–695, 2006.

Z, M. M.; HASSAN, Z. K.; ZEKRI, A. R. N.; *et al.* MicroRNAs and Metastasis-related Gene Expression in Egyptian Breast Cancer Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 591–598, 2012.

M, R.; HAMAM, D.; ALSALEH, K. A.; *et al.* Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 9, p. e3045–e3045, 2017.

IOND, M. E. H.; HAYES, D. F.; DOWSETT, M.; *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 7, p. e48-72, 2010.

HAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

IS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5287–5312, 2007.

; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p. 31, 2004.

GHAN, H. M.; MILLER, N.; LOWERY, A. J.; *et al.* Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer: **Annals of Surgery**, v. 251, n. 3, p. 499–505, 2010.

; LIU, Y.; DU, Y.; CHENG, T.; XIA, W. Long non-coding RNA BLACAT1 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by miR-150-5p/CCR2. **Cell & Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 14, 2019.

G, S.; GUO, W.; TANG, Y.; *et al.* miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. **Oncology Reports**, v. 28, n. 5, p. 1831–1837, 2012.

Estimativa de câncer no brasil, 2020. Disponível online: <<http://inca.gov.br>> Acesso em: fev 07, 2020.

, M. V.; FERRACIN, M.; LIU, C.-G.; *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7065–7070, 2005.

OTO, T.; PUSZTAI, L. Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? **Cancer Medicine**, v. 2, n. 11, p. 81, 2010.

, T. ; HISAMORI, S. ; HOGAN, D. J. ; *et al.* miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway. **eLife**, v. 3, 2014.

K.; AHN, H.; SIM, J.; *et al.* Loss of microRNA-200a expression correlates with tumor progression in breast cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 163, n. 3, p. 242–251, 2014.

, X.; HUANG, H.; LI, Z.; *et al.* Blockade of miR-150 maturation by MLL-fusion/MYC/LIN-28 is required for MLL-related leukemia. **Cancer Cell**, v. 22, n. 4, p. 524–535, 2012.

AMAN, M.; RÖSKE, A.; LAUFER, T.; *et al.* MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11584, 2018.

Y, J. L.; GAMMON, M. D.; JOHN, E. M. Reproductive Factors and Breast Cancer. **Epidemiologic Reviews**, v. 15, n. 1, p. 47, 1993.

T. J.; VERKASALO, P. K. Endogenous hormones and the aetiology of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 1, n. 1, p. 8, 1999.

T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Epidemiology of breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 3, p. 133–141, 2001.

GHFARD, S.; ALIZADEH, A. M.; IRANI, S.; OMRANIPOUR, R. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17981, 2018.

R.; MORADI, S.; GHORBAN, S. Role of components of microRNA machinery in carcinogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 40, n. 1, p. 2–9, 2018.

IZUKA, K.; HANAZAWA, T.; KIKKAWA, N.; *et al.* Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell invasiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma. **Auris Nasus Larynx**, v. 45, n. 4, p. 301–308, 2018.

C. W.; ALHAMDOOSH, M.; SU, S.; *et al.* RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. **Bioinformatics Research**, v. 5, p. 1408, 2018.

IE, C. H.; GAL, S.; DUNLOP, H. M.; *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum samples with diffuse large B-cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 5, p. 672–675, 2008.

H.-R.; KIM, T.-H.; CHOI, K.-C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , revealed by estrogen receptor knockout mouse. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 2, p. 71–76, 2012.

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

Z. S.; GHADAMZADEH, M.; ARASHLOO, F. T.; *et al.* Recent advances of therapeutic targets based on the molecular mechanism in breast cancer: genetic mutations and implications for current treatment paradigms. **Journal of Hematology**, v. 12, n. 1, p. 38, 2019.

; LIU, S.; DUAN, Q.; *et al.* MicroRNA-142-5p promotes cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting *FOXO3*. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 5, p. 2394–2402, 2017b.

; XIAO, Z.; AI, F.; *et al.* miR-142-5p promotes development of colorectal cancer through targeting SDHB and facilitating aerobic glycolysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 92, p. 1–10, 2017.

; GUO, Z.; QIAN, H. Role of microRNA-150-5p/SRCIN1 axis in the progression of breast cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 3, p. 2221–2229, 2019.

AMBROS, A.; LOWE, S. W. The microcosmos of cancer. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 347–355, 2012.

; YOUNG, J.; PRABHALA, H.; *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer progression. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 247–256, 2010.

; LIU, T.; HUANG, W.; *et al.* MicroRNA regulatory pathway analysis identifies miR-142-5p as a negative regulator of TGF- β pathway via targeting SMAD3. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 71504–71513, 2016.

A, A. ; VIALE, G. ; CURIGLIANO, G. Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. **Immunotherapy**, v. 17, n. 1, p. 90, 2019.

E, M. D.; BENZ, C. C.; BOWERS, J.; *et al.* [No title found]. **Molecular Cancer**, v. 5, n. 1, p. 24, 2006.

GOU, A.; AKOUCHEKIAN, M. Therapeutic impacts of microRNAs in breast cancer by their roles in regulating proliferation and apoptosis in this disease. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 22, p. 130, 2017.

ELL, J. T.; OLSON, E. N. MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1172–1187, 2012.

ADRAEE, S. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications for clinical practice. **Journal of Radiology**, v. 4, n. 4, p. 0, 2012a.

HELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer diagnosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10513–10518, 2008.

, M.; CHEN, L.; RASSENTI, L. Z.; *et al.* miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by targeting expression of GAB1 and FOXP1. **Blood**, v. 124, n. 1, p. 84–95, 2014.

ER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 406, n. 6801, p. 50–56, 2001.

ER, R.; CALIN, G. A. MicroRNA profiling in cancer. **Clinical Science**, v. 121, n. 4, p. 141–158, 2011.

SCOLL, L. Extracellular nucleic acids and their potential as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. **Cancer Research**, v. 27, n. 3A, p. 1257–1265, 2007.

O, A.; ARAI, T.; KOJIMA, S.; *et al.* Dual strands of pre-miR-150 (miR-150-5p and miR-150-3p) act as antitumor miRNAs by targeting SPOCK1 in naïve and castration-resistant prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 1, p. 1–10, 2017.

World Health Organization. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization. <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2020.

A, P. M. M.; ALKHILAIWI, F.; CAVALLI, I. J.; *et al.* Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 171, n. 1, p. 713–723, 2018.

A, P. M. M.; VIEIRA, E.; LEMOS, D. S.; *et al.* Identification of miRNAs Enriched in Extracellular Vesicles Derived from Tumor Samples of Breast Cancer Patients. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 150, 2020.

A, P. M. Caracterização de microRNAs em vesículas extracelulares no câncer de mama. 2018. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná- UFPR, Curitiba, 2018.

A, J.; YADDANAPUDI, S. C.; PIGATI, L.; *et al.* MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 9125–9138, 2012.

KONSTANTINOOU, N.; NTOUFA, S.; CHARTOMATSIDOU, E.; *et al.* Differential microRNA Profiles and Their Functional Implications in Different Immunogenetic Subsets of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Molecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2013.

T, O. Breast intervention and breast cancer treatment options. **Radiologic Technology**, v. 86, n. 5, p. 535M-558M, 2015.

U, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 746–752, 2000.

FL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 4015–4021, 2001.

A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

L.; BALSLEV, E.; SØKILDE, R.; *et al.* Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer cells classified according to lymph node status. **Cellular Oncology**, v. 37, n. 3, p. 215–227, 2014.

D.; WANG, M.; GUO, W.; *et al.* Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. **Cell and Tissue Research**, v. 358, n. 3, p. 701–712, 2014.

, J. S.; FLETCHER, J. A.; LINETTE, G. P.; *et al.* The HER-2/ *neu* Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. **The Oncologist**, v. 8, n. 4, p. 307–325, 2003.

, B. M.; ROBLES, A. I.; HARRIS, C. C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 6, p. 389–402, 2010.

, A. S.; BROOM, B. M.; CRISTINI, V.; EDGERTON, M. E. Gene expression meta-analysis supports existence of a distinct molecular apocrine breast cancer with a role for androgen receptor and implies interactions with ErbB family. **BMC Medical Genomics**, v. 2, n. 1, p. 59, 2009.

DOW, D.; BOETES, C.; BURKE, W.; *et al.* American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 57, n. 2, p. 75–89, 2007.

BRIDGES, A. B.; ID, P.; ABRAHAM, J.; CHAN, S.; *et al.* Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 5, p. 421–430, 2020.

WATTS, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Modern Pathology**, v. 23, n. S2, p. S60–S64, 2010.

WANG, Y.; ER, A. L. ; SARVER, A. E. ; Yuan, C. ; SUBRAMANIAN, S. OMCD: OncomiR Cancer Database. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 223, 2018.

DE LUCA, M. A.; ATÌ, S.; DE SUMMA, S.; PILATO, B.; *et al.* Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis and prognosis. **Targets and Therapy**, v. 9, p. 7355–7365, 2016.

BRADLEY, J. L.; L, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 5–17, 2020.

WANG, Y.; DAN, S. P. 5 year Overall survival of triple negative breast cancer: A single institution experience. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 15_suppl, p. e12580–e12580, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. J. L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. New York, NY: Springer, 2011.

WANG, Y.; S.; AJANI, J. A. The role of microRNAs in cancers of the upper gastrointestinal tract. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 109–118, 2013.

WANG, Y.; S.; PROVAN, P. J.; KIM, E.; *et al.* Profiling differential microRNA expression between in *situ*, infiltrative and invasive breast cancer: a pilot study. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 35, n. 1–2, p. 3–13, 2018.

WANG, Y.; S.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subtypes with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

WANG, Y.; S.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

N, D. F.; HEFFERNAN, P. A.; WEINBERG, R. A. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 5, p. 1729–1740, 1986.

TA, B.; GILL, M.; MAHAJAN, A.; *et al.* Differentially expressed miRNAs in triple negative breast cancer between African American and non-Hispanic white women. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, 2016. Disponível em: [/www.onscotarget.com/fulltext/13024](http://www.onscotarget.com/fulltext/13024)>. Acesso em: 9/3/2020.

TA, B. M. Análise integrada comparativa do padrão de expressão de miRNAs e alteração de número de cópias de microRNAs em portadoras de carcinoma mamário triplo-negativo dos grupos populacionais de negras-americanas, brancas americanas, hispânicas e brasileiras. 2018. Tese (Doutorado em Genética), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2018.

ONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 13, p. 3666–3670, 2016.

WU, W.; XU, P.; WANG, H.; *et al.* MicroRNA-150 suppresses triple-negative breast cancer metastasis through targeting miR-150. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 2319–2332, 2018.

LI, H.-P.; HUANG, S.-F.; LI, C.-F.; CHIEN, H.-T.; CHEN, S.-C. Differential microRNA expression in breast cancer with early onset age. **PloS One**, v. 13, n. 1, p. e0191195, 2018.

ANTIN, M. D.; DA SILVA, S. D.; PRIVAT, M.; ALAOUJ-JAMALI, M.; BIGNON, Y.-J. Molecular insights on basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 1, p. 21–30, 2012.

CHOONEVELD, E.; WILDIERS, H.; VERGOTE, I.; *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. R34, 2015.

CHOONEVELD, E.; WOUTERS, M. C.; VAN DER AUWERA, I.; *et al.* Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. R34, 2012.

LI, B.; LI, J.; SUN, M.; SUN, L.; ZHANG, X. miRNA expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and clinicopathologic features. **IUBMB life**, v. 66, n. 5, p. 371–377, 2014b.

LI, H.; TAN, G.; DONG, L.; *et al.* Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34210, 2012.

LI, J.; HUANG, S.; ZHAO, M.; *et al.* Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e87451, 2014.

LI, Z.; WANG, P.; CAO, L.; *et al.* Long Intergenic Non-Coding RNA 01121 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Invasion via the miR-150-5p/HMGA2 Axis. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 10859–10870, 2019.

NABE, A.; TAGAWA, H.; YAMASHITA, J.; *et al.* The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 25, n. 8, p. 1324–1334, 2011.

LI, J.; JIN, H.; YANG, Z.; *et al.* MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic miR-150. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 392, n. 3, p. 340–345, 2010.

KENBIEKE, D.; WANG, J.; LI, Y.; MA, C. miRNA-150 downregulation promotes pertuzumab resistance in ovarian cells via AKT activation. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 292, n. 5, p. 1109–1116, 2015.

; WANG, W. MicroRNA - 142-5p modulates breast cancer cell proliferation and apoptosis by targeting phosphatase homolog. *Molecular Medicine Reports*, 2018b. Available at: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8812>>. Accessed on: 3/9/2020

.-W.; SUN, X.-F.; YANG, G.-T.; *et al.* Increased expression of microRNA-150 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 1, p. 842–846, 2015.

; LI, D.; ZHANG, Y.; *et al.* MiR-142-5p Acts as a Significant Regulator Through Promoting Proliferation, Invasion and Apoptosis in Breast Cancer Modulated by Targeting SORBS1. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 18, p. 3381989226, 2019c.

ETTI, M.; MANSUTTI, M.; GOMEZ, P.; *et al.* Pathological complete response rates following different neoadjuvant chemotherapy regimens for operable breast cancer according to ER status, in two parallel, randomized phase II trials with a crossover study design (ECTO II). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 3, p. 843–851, 2012.

G, X.; YAN, Z.; ZHANG, J.; *et al.* Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence-free survival in breast cancer patients following surgical resection. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 22, n. 10, p. 2257–2266, 2011.

W.; QIN, W.; ATASOY, U.; SAUTER, E. R. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. **BMC research notes**, v. 2, p. 89, 2009.