

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYANA SCHULTZ JUCOSKI

microRNAs miR-142-5p, 146a-5p E miR150-5p NO CÂNCER DE MAMA:
POTENCIAIS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E ESTUDO DE EFEITOS
FUNCIONAIS DO miR-146a-5p

CURITIBA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYANA SCHULTZ JUCOSKI

microRNAs miR-142-5p, 146a-5p E miR150-5p NO CÂNCER DE MAMA:
POTENCIAIS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E ESTUDO DE EFEITOS
FUNCIONAIS DO miR-146a-5p

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Enilze M. S. F. Ribeiro

CoOrientadora:

Prof^a. Dr^a. Danielle Malheiros Ferreira

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Jucoski, Tayana Schultz
microRNAs miR-142-5p, 146a-5p e miR150-5p no câncer de mama :
potenciais biomarcadores plasmáticos e estudo de efeitos funcionais do
miR-146a-5p. / Tayana Schultz Jucoski. – Curitiba, 2021.
133 p.: il.

Orientadora: Enilze M. S. F. Ribeiro.
Coorientadora: Danielle Malheiros Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Câncer. 2. MicroRNAs. 3. Biópsia líquida. 4. Catalase. I.
Título. II. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca, 1958-. III. Ferreira,
Danielle Malheiros. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 616.99449



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 tese de Doutorado de **TAYANA SCHULTZ JUCOSKI** intitulada: **microRNAs miR-142-5p, 146a-5p e miR150-5p no câncer de mama: Potenciais biomarcadores plasmáticos e estudo de efeitos funcionais do miR-146a-5p**, sob orientação da Profa. Dra. ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 30 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

06/10/2021 10:31:27.0

ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/10/2021 10:51:30.0

BRUNA MAYUMI SUGITA
Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO
PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica

11/10/2021 20:59:07.0

ANA PAULA MARTINS SEBASTIAO
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MEDICA,
UFPR.)

Assinatura Eletrônica

11/10/2021 12:43:43.0

DOUGLAS ADAMOSKI MEIRA
Avaliador Externo (LABORATÓRIO NACIONAL DE BIOCÊNCIAS -
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP))

Dedico esse trabalho ao meu avô Odilon Schultz por ter me incentivado, mesmo sem saber, minha curiosidade e vontade de investigação do que gerava questionamentos ao longo de minha infância sendo essencial para meu desenvolvimento como pesquisadora científica.

Serei eternamente grata. Te amo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná por proporcionar minha formação assim como o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, seus professores e funcionários, pelo auxílio e aprendizado adquirido nestes anos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro essencial para o término deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Enilze M. S. F. Ribeiro, que me acolheu ainda no início da graduação e me apresentou a genética do câncer. Gostaria de agradecer a excelente orientação nesses anos, os valiosos ensinamentos e contribuições que foram essenciais para minha evolução dentro da área. Agradeço pelos momentos em que me acolheu, me compreendeu e me motivou a seguir em frente, por confiar o projeto a mim e me deixar andar com minhas próprias pernas, mas sempre mantendo-se por perto quando eu precisava.

A minha coorientadora Prof^a Dr^a Danielle Malheiros Ferreira, pela orientação, aprendizado, contribuições e apoio na realização deste trabalho e por se fazer presente sempre que necessário ao longo dessa caminhada.

Ao professor Dr. Iglenir João Cavalli, que com sua imensa simpatia e inteligência me ensinou muito mais do que ciência, me mostrou a importância de ser uma boa pesquisadora além dos aspectos técnicos. Obrigada pelo acolhimento e disposição para responder a meus questionamentos.

As professoras, Dr^a Daniela Fiori Gradia e Dr^a Jaqueline Carvalho de Oliveira, que se mostraram dispostas a me auxiliar principalmente na parte experimental, por sempre se mostrarem dispostas a sanar minhas dúvidas e discutir meus questionamentos. Obrigada pelo auxílio ao longo do desenvolvimento do trabalho colaborando para o resultado final.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), seus integrantes e ex-integrantes, pelo apoio, ajuda e por compartilharem diversos momentos difíceis e de alegria. Agradeço em especial a Ana Luiza Mattana, Érika P. Zambalde, Patrícia M. Ozawa, Talita H. B. G. Lazarotto, Rafaela N. Vieira e Jéssica Barazetti por sempre estarem ao meu lado me dando forças para continuar celebrando as pequenas vitórias, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Também agradeço a Ana Carolina Rodrigues e ao Alexandre Azevedo pelo auxílio para a conclusão de experimentos na fase final desse período, por me ensinarem e se dedicarem para que tudo desse certo. Assim como a Tamyres M. Carvalho que foi essencial durante todo o processo, colaborando com ideias, experimentos e apoio constante.

Aos meus pais, Edson e Andréa, a minha irmã Natália e toda minha família, pelo carinho e apoio constante, por compreenderem meus momentos de ausência, por me acolherem nos momentos difíceis e por sempre acreditarem em mim.

Ao Luca, meu companheiro, sempre compreensivo, disposto a ajudar em todos os momentos e por me motivar a seguir em frente sempre que me questioneei sobre minhas escolhas.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio e estímulo, e também pelos momentos de descontração e alegria.

E, principalmente, as pacientes e voluntárias que aceitaram participar e colaborar com este trabalho. Sem elas não seria possível a realização dos estudos e a geração de conhecimento. Espero que em breve possamos contribuir de maneira direta para a luta de vocês.

“Pesquisar é acordar para o mundo”

Marcelo Lamy

RESUMO

No Brasil foram estimados para 2020-2022 cerca de 61,61 casos de câncer de mama (CM) a cada 100 mil mulheres. Políticas públicas como a mamografia juntamente com análises histológicas e moleculares têm como principal objetivo o diagnóstico precoce da doença. Nos últimos anos, diferentes métodos vêm sendo desenvolvidos para auxiliar também no prognóstico e abordagem terapêutica. Nesse cenário, a identificação de novos biomarcadores, assim como de procedimentos menos invasivos, como a biópsia líquida, vem ganhando espaço. Os miRNAs são explorados no âmbito clínico por atuarem diretamente na regulação da expressão gênica. Além disso, são observados livres e carregados por vesículas extracelulares (VEs) nos fluídos corporais como sangue, facilitando a obtenção. Diante disso, o presente estudo selecionou, a partir de dados públicos e trabalhos anteriores do grupo, três miRNAs (miR-142-5p, miR-146a-5p, miR-150-5p) para avaliação em plasma de pacientes com câncer de mama. Dentre eles, o miR-142-5p apresentou diferença de expressão significativa, sendo menos expresso nas pacientes quando comparadas aos controles ($p = 0,0349$), demonstrando um potencial diagnóstico. A expressão do miR-150-5p nesse grupo de pacientes não apresentou diferenças de expressão. O papel do miR-146a-5p na patogênese mamária foi explorado através de ensaios funcionais na linhagem MCF-7. A morte por apoptose foi reduzida após o aumento da expressão desse miRNA ($p < 0,0001$) enquanto observou-se aumento na capacidade de formação de colônias ($p = 0,0013$), características essenciais para a progressão do CM. Conjuntamente, a expressão da catalase (CAT), um alvo predito de miR-146a-5p, foi avaliada. A análise por *western blotting* demonstrou que a expressão de CAT acompanhou a maior expressão do miRNA na linhagem MCF-7, indicando uma relação entre ambos, mas que precisa ser mais explorada uma vez que há poucas informações na literatura. Portanto, o presente estudo sugere um importante papel dos miRNAs miR-142-5p e miR-146a-5p no diagnóstico e prognóstico do CM contribuindo para a geração de informações sobre essas moléculas e servindo de impulso para pesquisas futuras.

Palavra-chave: Câncer de mama, miRNA, miR-142-5p, miR146a-5p, biópsia líquida, catalase, ensaios funcionais

ABSTRACT

In Brazil, around 61.61 cases of breast cancer (BC) were estimated for 2020-2022 for every 100,000 women. Therefore, public policy such as mammograph together with histological and molecular analysis have as their main objective the early diagnosis of the disease. In recent years, different methods have been developed to also help with prognosis and therapeutic approach. In this scenario, the identification of new biomarkers and minimally invasive procedures, such as liquid biopsy, has been increased. The miRNAs are explored in the clinical scope for acting directly in the regulation of gene expression. Besides, they are observed free and carried by extracellular vesicles (EVs) in body fluids such as blood, making it easier to obtain. Therefore, the present study selected, from public data and previous studies of the group, three miRNAs (miR-142-5p, miR-146a-5p, miR-150-5p) for evaluation in plasma of BC patients. Among them, the miR-142-5p showed a significant difference in expression, being less expressed in patients when compared to controls, demonstrating a diagnostic potential. miR-150-5p expression in this sample does not exhibit differences between groups. The role of miR-146a-5p in BC pathogenesis was explored through functional assays in the MCF-7 cell line. Death by apoptosis was reduced after the increase in the expression of miR-146a-5p while an increase in the ability to form colonies was observed, both essential characteristics for BC progression. In parallel, catalase (CAT) expression, a predicted target of miR-146a-5p, was evaluated. Western blotting analysis showed that CAT expression accompanied the miRNA overexpression in MCF-7 lineage, suggesting a relationship between them. Nonetheless, these results need to be further explored since there is little information in the literature. Therefore, the present study suggests the important role that miR-142-5p and miR-146a-5p can play in the diagnosis and prognosis of BC, contributing to the generation of information about these molecules and serving as an impetus for future research.

Keyword: Breast cancer, miRNA, miR-142-5p, miR146a-5p, liquid biopsy, catalase, functional assays

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES MAMÁRIOS	25
FIGURA 2 - BIOGÊNESE DE miRNAs.....	33
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE BIÓPSIA TECIDUAL E BIÓPSIA LÍQUIDA ..	36
FIGURA 4 - BIÓPSIA LÍQUIDA EM CÂNCER.	37
FIGURA 5 - ESQUEMA DAS ETAPAS DA ANÁLISE DOS DADOS DO TCGA PARA SELEÇÃO DE miRNAs.....	43
FIGURA 6 - ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DO miR-146a-5p <i>MIMIC</i> NA LINHAGEM MCF-7	51
FIGURA 7 – NÚMERO DE miRNAs COM FOLD CHANGE ≥ 2 ENTRE TRIPLO NEGATIVO E DEMAIS GRUPOS.....	59
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIFICAÇÃO DO miRNA-142-5p, miRNA-146a-5p E miRNA-150-5p POR RT-qPCR EM PLASMA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CONTROLES	64
FIGURA 9- REGULADORES <i>UPSTREAM</i> PARA PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM AMOSTRAS DE TUMOR DE MAMA PRIMÁRIO	66
FIGURA 10 - RELAÇÃO DO miR-146a-5p E CATALASE POR ANÁLISE IN SÍLICO	67
FIGURA 11 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO miR-146a-5p EM LINHAGENS DE ..	68
FIGURA 12 - ENSAIO CLONOGÊNICO EM MCF-7	70
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	70
FIGURA 14 - ENSAIO DE APOPTOSE CELULAR EM MCF-7	71
FIGURA 15 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR EM MCF-7.....	72
FIGURA 16 - ANÁLISE PROTEICA DA CATALASE NA LINHAGEM MCF-7 DIANTE DA SUPER EXPRESSÃO DO miR-146a-5p	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.....	45
TABELA 2 - PROGRAMA DE CICLAGEM DE qPCR.....	48
TABELA 3 - ANÁLISE DE <i>mi</i> RNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA A PARTIR DE DADOS DO TCGA.....	58
TABELA 4 - <i>mi</i> RNAS COM FOLD CHANGE ≥ 2 COMUNS ENTRE TN E DEMAIS GRUPOS	60
TABELA 5 - TOP 20 VIAS KEGG COMUNS PARA OS <i>mi</i> R-142-5p, <i>mi</i> R-146-5p E <i>mi</i> R-150-5p	61
TABELA 6 - ANÁLISE DE GENE ONTOLOGY (GO) PARA OS <i>mi</i> R-142-5p, <i>mi</i> R-146-5p E <i>mi</i> R-150-5p.....	62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E CORRESPONDÊNCIA COM SUBTIPOS MOLECULARES.....	29
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ	Delta
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	Grau <i>Celsius</i>
Ago	Argonauta
AM	Apócrino molecular
AnexV	Anexina V
APC	<i>APC regulator of WNT signaling pathway</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BL	Basal- <i>like</i>
BRCA	<i>Breast cancer gene</i>
BRMS1	<i>BRMS1 Transcriptional Repressor and Anoikis Regulator</i>
CA15-3	Antígeno carboidrato 15-3
CAT	Catalase
CB	Claudina baixa
CD	Carcinoma ductal
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cDNA	DNA complementar
c-DNA	DNA circulante
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CFH	Fator complementar H

cf-NA	Ácidos nucléicos livres circulantes
cf-miR	microRNAs livres circulantes
cf-RNA	RNA livre circulante
CK	Citoqueratina
CL	Carcinoma lobular
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CM	Câncer de mama
c-miR	microRNAs circulantes
c-NA	Ácidos nucléicos circulantes
c-RNA	RNA circulante
cm ²	Centímetro quadrado
c-miR	miRNA circulante
CO ₂	Gás carbônico
Cq	Ciclo de quantificação
CT	Controle
CTC	Células tumorais circulantes
ctDNA	DNA tumoral circulante
CV	Cristal violeta
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DICER	<i>Dicer 1, Ribonuclease III</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERBB2 ou HER2	Receptor de crescimento epidérmico humano tipo 2

EROS	Espécies reativas de oxigênio
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FS	Fosfatidilserina
G	Força g
g	Gramma
GH	Grau histológico
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IHQ	Imunoistoquímica
IM	Imunomodulador
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iEGFR	Inibidor de EGFR
IPA	<i>IngenuityR Pathway Analysis</i>
iPARP	Inibidor de PARP
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação celular
KRAS	KRAS Proto-Oncogene
LA	Luminal A
LAR	<i>Luminal androgen receptor</i>
LB	Luminal B

LFH	Lactotransferrina
lncRNAs	RNA longo não codificante
M	Molar
mg	Miligrama
miR ou miRNA	microRNAs
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MSL	<i>Mesenchymal stem-like</i>
NaCl	Cloreto de sódio
ncRNA	RNA não codificante
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i>
NL	<i>Normal-like</i>
Nm	Nanômetro
NTN	Não triplo negativo
O ₂	Oxigênio
PAM50	<i>Prediction analysis of microarray</i>
PARP	<i>Poly(ADP-Ribose) Polymerase</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de Propídio
PGLYRP2	Proteína de reconhecimento de peptideoglicano
pmol	Picomolar

Pri-miRNA	miRNA primário
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and Tensin Homolog gene</i>
qPCR	PCR quantitativa
RA	Receptor de andrógeno
RE	Receptor de estrógeno
RIP1	Proteína de interação ao receptor 1
RNA	Ácido ribonucléico
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RP	Receptor de progesterona
RT	Transcrição Reversa
RT-qPCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	RNA de interferência
SOE	Carcinoma invasivo sem outra especificação
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween[®] 20</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TEMED	N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina
TEP	<i>Tumor educated platelets</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TN	Triplo negativo
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
TRBP	<i>TARBP2 Subunit of RISC Loading Complex</i>

UNG	Uracil-N-Glicosilase
UCSC	Universidade da Califórnia em Santa Cruz
VE	Vesícula extracelular
XPO5	Exportina 5
WB	<i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 CÂNCER DE MAMA	23
2.1.1 Classificação do câncer de mama	24
2.1.1.1 Classificação TNM e histológica	24
2.1.1.2 Classificação Molecular	26
2.1.1.3 Classificação Imunoistoquímica	28
2.1.2 Detecção precoce e manejo do câncer de mama	31
2.2 microRNAs NO CÂNCER DE MAMA	32
2.2.1 Biópsia Líquida	35
2.3 ENSAIOS FUNCIONAIS	38
3. OBJETIVO	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	42
4.2 Seleção de miRNAs candidatos	42
4.3 Caracterização da amostra	44
4.4 Processamento de amostras de plasma	46
4.5 Extração de RNA total	46
4.6 Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (RT-qPCR)	47
4.7 Ensaios funcionais do miR-146a-5p	48
4.7.1 Cultivo celular	48
4.7.2 Contagem de células em câmara de Neubauer	49
4.7.3 Transfecção do miR-146a-5p na linhagem MCF-7	49
4.7.4 Ensaio de viabilidade celular	51
4.7.5 Ensaio de Capacidade Clonogênica	52
4.7.6 Ensaio de Apoptose	53
4.7.7 Ensaio de Migração	54
4.8 <i>Western blotting</i>	54
4.9 Análise estatística	56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Seleção de miRNAs candidatos	58
5.2 Avaliação da quantificação de miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p em plasma de pacientes com câncer de mama primário por RT-qPCR.....	63
5.3 Análise <i>in vitro</i> do miR-146a-5p.....	65
5.3.1 Aumento da expressão de miR-146a-5p aumenta a capacidade clonogênica e a expressão de CAT enquanto reduz a apoptose em MCF-7 .	69
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	75
7. REFERENCIAS	76
8. APÊNDICES.....	86
APÊNDICE 1 – Artigo: <i>Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free miRNAs as biomarkers</i>	86
APÊNDICE 2 – Artigo: <i>What is the role of miR-146a in breast cancer? An integrative review</i>	107
APÊNDICE 3 – Participação em trabalhos no período de realização do doutorado (2018-2021).....	124
9. ANEXOS	125
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	125
ANEXO 2 – PROTOCOLO DO PROCESSO DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA.....	130
ANEXO 3 – PROTOCOLO DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	132
ANEXO 4 – PROTOCOLO DO ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA...	132
ANEXO 4 – PROTOCOLO DO ENSAIO DE APOPTOSE.....	132
ANEXO 5 – PROTOCOLO NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO	133

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o de maior incidência no mundo e a primeira causa de morte por câncer em mulheres (Sung *et al.*, 2021). No Brasil foram estimados, para cada ano do triênio 2020-2022, cerca de 61,61 casos de CM para cada 100 mil mulheres colocando-o como o mais incidente depois do câncer de pele do tipo não melanoma (INCA, 2019).

Diante disso, políticas públicas de saúde nessa área vêm sendo desenvolvidas desde a década de 1980, como o estabelecimento da mamografia, que conjuntamente com análises histológicas e moleculares, tem como principal objetivo o diagnóstico precoce da doença. Atualmente o estabelecimento de biomarcadores, como os microRNAs (miRNAs), que permitam a identificação do tumor assim como sua classificação é de grande relevância no crescente campo da medicina personalizada.

Neste âmbito, a biópsia líquida, por meio de biomarcadores em fluidos corporais, tem se mostrado promissora no diagnóstico, prognóstico e direcionamento terapêutico de pacientes com câncer (Asante *et al.*, 2020; Culliane *et al.*, 2020; Puche-Sanz *et al.*, 2020; Heidrich *et al.*, 2021). Perante a ascensão dessa abordagem na oncologia, o presente estudo procurou: i) selecionar, a partir de dados públicos e trabalhos anteriores do grupo, miRNAs diferencialmente expressos em tecido tumoral e não-tumoral, entre subtipos imunoistoquímicos e entre parâmetros prognósticos. Em seguida, verificar se os mesmos podem ser encontrados como marcadores circulantes (c-miRNAs) em mulheres portadoras de carcinomas primários de mama, de maneira a contribuir para o campo de biomarcadores minimamente invasivos; e ii) investigar o efeito funcional do aumento de expressão do miR-146a-5p (selecionado na primeira abordagem) contribuindo com o entendimento da patogênese do carcinoma mamário e com a possibilidade de novos alvos terapêuticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer com maior incidência na população mundial correspondendo a 11,7% dos casos em 2020, representando 2,3 milhões de novos casos diagnosticados em mulheres, segundo estimativas do Projeto Globocan da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para cada ano do triênio 2020-2022, 66.280 novos casos de câncer de mama (INCA, 2019).

O CM é um conjunto de doenças que exibe variabilidade genética, características histopatológicas distintas, prognósticos diferentes e respostas terapêuticas variadas (Vargo-Gogola e Rosen, 2007). Se diagnosticado e tratado precocemente a probabilidade de sobrevida global e/ou de sobrevida livre da doença aumenta, enquanto o diagnóstico tardio é um dos responsáveis pelo índice elevado de mortalidade observado (Thuler e Mendonça, 2005).

O câncer é uma doença multifatorial e diferentes fatores genéticos e ambientais podem contribuir para seu desenvolvimento. No CM alguns fatores são considerados de risco uma vez que conferem maior chance de desenvolver esse tipo de câncer. Dentre estes: idade, presença de história familiar de câncer de mama e/ou ovário, alta densidade do tecido mamário, sedentarismo e obesidade, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher (idade da menarca e menopausa, número de gestações, tempo de amamentação, uso de anticoncepcionais ou outros hormônios), e alterações em genes relacionados com a doença (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, entre outros) (Alexeeff *et al.*, 2019; Chong *et al.*, 2020; Britt *et al.*, 2020; Kanadys *et al.*, 2021).

Aproximadamente 30% dos casos de CM podem ser evitados por adoção de medidas relativamente simples, como alimentação saudável, manutenção do peso e prática regular de atividade física (INCA, 2014). Diante disso, a prevenção inicial mostra-se essencial e, conjuntamente, com os esforços de detecção precoce e desenvolvimento de novas terapias têm refletido na sobrevida dos pacientes. Entre os anos 2007-2016, a taxa de mortalidade entre pacientes com CM, na média, tem reduzido 1,8% por ano nos Estados Unidos da América (EUA) (ACS., 2019).

No entanto a complexidade do CM segue sendo o maior desafio de médicos e pesquisadores. Diante disso, a busca cada vez maior pelo entendimento da doença tem permitido sua subdivisão refletindo diretamente no norteamiento da melhor abordagem para cada paciente e no aumento da sobrevida.

2.1.1 Classificação do câncer de mama

O CM é uma neoplasia heterogênea que exhibe subtipos com diferentes aspectos histológicos e genéticos; manifestações clínicas, e respostas a tratamentos. Essa diversidade se torna um desafio para o manejo dos pacientes principalmente com relação a predição de prognóstico e direcionamento terapêutico (Parker *et al.*, 2009). Ao longo dos anos, o aumento da geração de informações devido aos avanços tecnológicos demonstra que a estratificação do CM é mutável. Diante disso, observa-se uma atualização constante das informações sobre a doença que tem impacto direto em seu manejo.

Diferentes abordagens podem ser usadas para classificar o CM considerando-se várias características como, por exemplo, tamanho do tumor, método de detecção, expressão de biomarcadores e presença de alterações genéticas. Classicamente, a base do diagnóstico de CM é pautada na análise histológica do tecido.

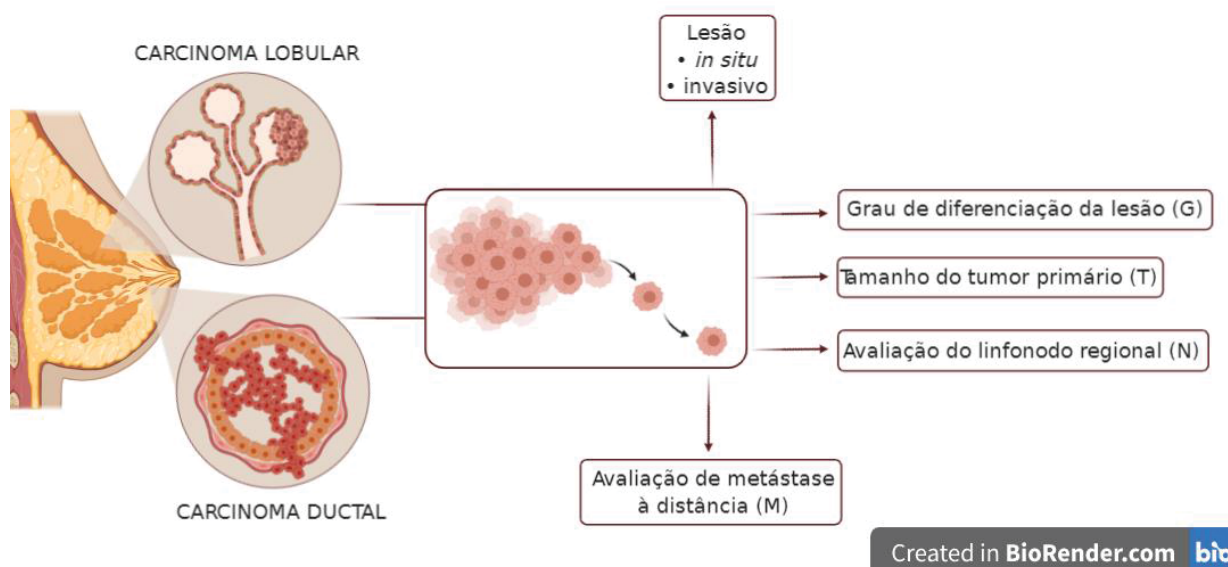
2.1.1.1 Classificação TNM e histológica

O câncer pode ser classificado de acordo com o Sistema de Classificação de Tumores Malignos (TNM) criado na década de 1950 por Pierre Denoix (1952). Essa diretriz leva em consideração três elementos: a extensão do tumor primário (T), a presença/ausência e extensão de metástases em linfonodos regionais (N) e a presença/ausência de metástases à distância (M) (Figura 1) (Amin *et al.*, 2018).

Os tumores de mama podem ser classificados em, pelo menos, 21 subtipos histológicos distintos a partir do tecido de origem (Kleihues e Sobin, 2000; Tavassoli e Devilee, 2003; WHO, 2019). Os subtipos histológicos são importantes para o prognóstico uma vez que refletem o estado atual de conhecimento sobre a doença. Os mais comuns são o carcinoma lobular (CL), quando se estabelece nos lóbulos

mamários; e o carcinoma ductal (CD) quando se desenvolve nos ductos que conectam os lóbulos ao mamilo (FIGURA 1). Outros subtipos são os tumores adenomatoso, medular, mucinoso, papilífero, tubular, metaplásico e micropapilar (Dieci *et al.*, 2014; WHO, 2020).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES MAMÁRIOS



Representação dos tipos histológicos de câncer de mama mais frequentes, ductal e lobular. Após a definição da região onde o tumor está se desenvolvendo (ducto ou lóbulo) são avaliadas outras características como: *status* da lesão com relação ao poder invasivo (*in situ* ou invasivo), grau de diferenciação das células tumorais (GI, GII ou GIII), tamanho do tumor primário (em milímetros), avaliação da presença/ausência de células tumorais no linfonodo regional (no caso de câncer de mama avalia-se os linfonodos axilares), e avaliação da presença/ausência de metástases a distância.
FONTE: A autora, criado no BioRender, 2020.

Além disso, pode-se classificar as lesões em *in situ*, quando a massa tumoral não apresenta a capacidade de invadir a membrana basal subepitelial, ou invasivo, quando as células tumorais rompem a barreira da membrana basal invadindo tecidos e órgãos adjacentes sendo capazes de desenvolver metástases.

A maioria dos tumores de mama diagnosticados apresentam capacidade invasivas, sendo 75-80% carcinoma ductal invasivo (CDI) ou carcinoma invasivo sem outra especificação (SOE) (Seer *et al.*, 2018; ACS, 2019; Cserni *et al.*, 2020). Na maioria das situações, o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) pode ser o precursor do CDI, porém nem todos os tumores CDIS são capazes de progredir. O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é, comumente, considerado como uma lesão benigna associada ao

aumento do risco de desenvolver CM, porém não exibe potencial para progressão (ACS, 2019).

A análise histológica dos tumores mamários também avalia outros parâmetros, como tamanho da massa tumoral e o fenótipo das células, esse levando a atribuição de um grau histológico.

A avaliação do grau histológico (G) pode trazer informações importantes sobre o comportamento clínico do CM, em especial para tumores iniciais menores. O G permite dividir morfolologicamente os tumores mamários de acordo com o grau de diferenciação em relação às células epiteliais mamárias normais (Elston e Ellis., 1991; UK-RCPPath, 2005; Rakha *et al.*, 2010).

Tumores com grau I (baixo grau) apresentam células bem diferenciadas, ou seja, com características claramente de células mamárias normais; no grau II (grau moderado) as células estão moderadamente diferenciadas uma vez que exibem alguma perda das características do tecido mamário; e no grau III (alto grau) observa-se células pouco diferenciadas que não possuem características normais e tendem a crescer mais rapidamente. A divisão em graus é usada como um indicativo de malignidade uma vez que seu aumento está associado a um prognóstico mais desfavorável (Carter *et al.*, 1989). Diante disso, tumores que exibem GH alto, tem mais chances de apresentarem metástases a distância e maiores taxas de recorrência.

A classificação histológica tradicional continua sendo a abordagem primária de análise de uma massa tumoral na mama, apesar dos avanços moleculares dos últimos anos (WHO, 2019). No entanto, é importante ressaltar que dados genéticos e moleculares são incorporados constantemente à classificação de CM tornando-a dinâmica.

2.1.1.2 Classificação Molecular

Em 2000, Perou e colaboradores analisaram a expressão de 1.753 genes em amostras de tecido mamário normal e tumoral sugerindo que a diversidade fenotípica exibida pelos tumores estaria relacionada com a diversidade genética encontrada nessa neoplasia. Análises subsequentes levaram à divisão do CM em cinco subtipos moleculares: luminal A (LA), luminal B (LB), HER2 enriquecido

(HER2+), basal-*like* (BL) e normal-*like* (NL) (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001, 2003).

Os subtipos moleculares luminais (LA e LB) compartilham características moleculares semelhantes às células luminais normais da mama. O LA exibe alta expressão de marcadores luminais, por exemplo citoqueratinas de baixo peso molecular (CK7, CK8, CK18 e CK19), moléculas de adesão celular epitelial e do receptor de estrogênio (RE) e genes associados. Além disso, apresenta um melhor prognóstico devido a resposta à terapia com antiestrogênicos. O LB possui uma expressão moderada ou reduzida destes marcadores luminais, e também alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular e proliferação exibindo um pior prognóstico devido a maior observação de recidivas (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001, 2003; Birnbaum *et al.*, 2004).

O subtipo molecular HER2 enriquecido tem como principal característica a superexpressão do oncogene *ERBB2* (fator de crescimento epidérmico humano 2 ou *HER2*) e/ou genes relacionados. A amplificação deste gene é vista como um importante biomarcador de prognóstico para o CM. Pacientes com este subtipo apresentam boa resposta a drogas que bloqueiam a atividade da proteína HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal Trastuzumabe (Beselga, *et al.*, 1996; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001, 2003).

O subtipo basal-*like* (ou semelhante ao basal) apresenta aumento da expressão de vários genes característicos das células mioepiteliais ou células basais do tecido mamário, como as citoqueratinas de alto peso molecular (CK5, CK14 e CK17), P-caderina, CD10, β 4-integrina e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Este grupo molecular também está relacionado com mutações nos genes *BRCA* (*BRCA1* e *BRCA2*), e um prognóstico desfavorável frente aos demais subtipos (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001, 2003; Vieira *et al.*, 2008; Badve *et al.*, 2011; Bertucci *et al.*, 2012). Apesar da ausência de um alvo terapêutico específico, algumas abordagens de tratamentos já vêm sendo adotadas para alguns desses pacientes. Um exemplo é a utilização dos inibidores de PARP (iPARP) em pacientes com mutações em *BRCA*, e de inibidores de *checkpoint* imunológico, como o anti-PD-L1 (Geenen *et al.*, 2017; Diana *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2020; Schmid *et al.*, 2020).

O subtipo normal-*like* (ou semelhante ao normal) reuniu tumores que apresentavam um aumento da expressão de diversos genes conhecidos que são expressos por outros tipos celulares que não os epiteliais, como o parênquima

mamário normal e os fibroadenomas. Além disso, observou-se aumento da expressão de genes epiteliais basais e reduzida expressão de genes do epitélio luminal. No entanto, ainda não é clara sua distinção dos demais subtipos moleculares assim como seu valor clínico (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2003)

Posteriormente foram sugeridos mais dois subtipos moleculares para o CM. Tumores denominados claudina baixa (CB), são caracterizados pela expressão reduzida dos genes das claudinas 3, 4 e 7, E-caderina, EpCAM e CD24, e aumento da expressão de genes relacionado com a transição epitelial-mesenquimal (TEM); e o subtipo apócrino molecular (AM), principalmente caracterizado pelo aumento da expressão do receptor de andrógeno (RA) (Farmer *et al.*, 2005; Herschkowitz *et al.*, 2007; Sanga *et al.*, 2009; Prat *et al.*, 2010).

2.1.1.3 Classificação imunoistoquímica

A identificação dos subtipos moleculares por meio do perfil de expressão gênica é complexa dificultando sua implementação na rotina clínica. A técnica de imunoistoquímica (IHQ) possibilita uma classificação simplificada do CM sendo amplamente empregada por meio da avaliação dos marcadores de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), superexpressão da proteína HER2 ou amplificação do gene *HER2*, e avaliação do índice de proliferação Ki-67. Portanto, os subtipos imunoistoquímicos podem não corresponder estritamente ao perfil de expressão gênica que caracteriza os subtipos moleculares de CM. Todavia, a análise por IHQ é capaz de sugerir a classificação molecular do tumor e mostra-se essencial no manejo do paciente (Goldhirsch *et al.*, 2013) (QUADRO 1).

Baseado na análise dos marcadores já mencionados, o câncer de mama pode ser dividido nos seguintes subtipos imunoistoquímicos: luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplo negativo (TN) (QUADRO 1).

O termo triplo negativo é utilizado para se referir a um grupo heterogêneo de tumores mamários que apresenta perda da expressão de RE/RP e da superexpressão de HER2. Pacientes TN exibem taxa aumentada de mortalidade em comparação aos demais apresentando recorrência em cinco anos em cerca de 30-50% dos casos (Azim *et al.*, 2019). Esse comportamento está relacionado com a característica mais

agressiva, altas chances de recidiva e metástase à distância, além da resistência à diversos fármacos observados nesse tipo tumoral (Carey *et al.*, 2007).

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E CORRESPONDÊNCIA COM SUBTIPOS MOLECULARES

Subtipo imunoistoquímico	Subtipo molecular ^a	RE	RP	HER2	Ki-67 ^b	Prognóstico/Resposta terapêutica
Luminal A	Luminal A	+	+	-	Baixo	Bom prognóstico. Boa resposta com hormonioterapia.
Luminal B	Luminal B	+	-	+	Alto	Prognóstico intermediário/desfavorável.
		+	+/-	-	Qualquer valor	Pior resposta com hormonioterapia, relacionado à recidiva tumoral.
HER2 positivo	HER2 enriquecido	-	-	+	Alto	Prognóstico desfavorável Boa resposta ao tratamento alvo
Triplo negativo	Basal-like					
	Claudina baixa					
	Apócrino molecular	-	-	-	Alto	Prognóstico desfavorável Sem alvo terapêutico específico
	Outros					

NOTA: ^a Indica os subtipos moleculares intrínsecos aos quais os subtipos imunoistoquímicos podem ser associados;

^b Os valores para o índice de proliferação de Ki-67 comumente usados são: alto = $\geq 14\%$; e baixo = $< 14\%$.

LEGENDA: RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; HER2 = receptor de crescimento epidérmico humano tipo 2; Ki-67 = antígeno marcador de proliferação celular; + = valor positivo que indica a expressão do marcador; - = valor negativo que indica ausência da expressão do marcador.

Fonte: Adaptado de Goldhirsch *et al.*, 2013; Reis-Filho e Pusztai, 2011 e Alizart *et al.*, 2012.

Aqui é importante destacar que os termos basal-*like* e triplo negativo não são sinônimos e partem de diferentes sistemas de classificação, molecular e imunoistoquímica respectivamente. É conhecido que esses subgrupos apresentam diversas semelhanças como instabilidade genômica, prevalência de alto GH, elevada

taxa proliferativa, alterações frequentes nos genes *BRCAs*, entre outros (Sorlie *et al.*, 2003).

Aproximadamente 70-80% dos tumores com fenótipo clínico de TN, identificados na IHQ, correspondem ao subtipo molecular intrínseco BL. Ou seja, nem todos os TNs são pertencentes ao grupo BL quando a expressão gênica é analisada. E o inverso também ocorre, em que nem todo BL irá se apresentar como TN na IHQ (HER2 ~ 10%; LB ~15-20%; e LA ~ 2-3%) (Prat *et al.*, 2013). Diante desse cenário, os estudos têm mostrado uma discordância de 20-30% na classificação entre as abordagens IHQ e molecular (avaliação realizada por meio do painel genético PAM50 – do inglês *Prediction Analysis of Microarray* - que avalia a expressão de 50 genes associados com importantes vias para a progressão do câncer de mama) (Parker *et al.*, 2009; Cheang *et al.*, 2012; Prat *et al.*, 2013; Bastien *et al.*, 2021). Assim, os TNs podem ser associados a outros grupos moleculares intrínsecos como CB (25-40%); HER2+ (14-22%); AM (7-16%); LB (4-9%); LA (3-5%); e NL (0-1%) podendo exibir uma menor taxa de proliferação e serem menos responsivos a alguns quimioterápicos, como a carboplatina e bevacizumabe, por exemplo (Prat e Perou, 2011; Prat *et al.*, 2013; Azim *et al.*, 2020).

Além da abordagem de correspondência entre as classificações molecular e IHQ, é proposta uma subclassificação distinta para os tumores TN a partir de análises de expressão gênica (Lehmann *et al.*, 2011; Marra *et al.*, 2019). Assim, seis subtipos são sugeridos: basal-like 1 (BL1); basal-like 2 (BL2); imunomodulador (IM); mesenquimal (M); mesenquimal semelhante às células tronco (MSL, do inglês *mesenchymal stem-like*); e receptor de andrógeno luminal (LAR, do inglês *luminal androgen receptor*) (Lehmann *et al.*, 2011; Burstein *et al.*, 2015; Marra *et al.*, 2019). Essa abordagem de estratificação do TN tem como objetivo compreender sua heterogeneidade elencando características que possam contribuir com sua identificação e auxiliar no direcionamento de estudos na área de terapias. No entanto, a estratificação do TN ainda não é viável na prática clínica uma vez que são necessários mais ensaios clínicos focados nas diferentes respostas terapêuticas observadas nesses pacientes (Lehmann *et al.*, 2011, 2016; Masuda *et al.*, 2013).

2.1.2 Detecção precoce e manejo do câncer de mama

Nas últimas décadas a taxa de sobrevivência de mulheres acometidas pelo CM está em ascensão devido, principalmente, à identificação precoce e desenvolvimento de terapias específicas que proporcionam um aumento nas taxas de recuperação. Cerca de 90% das mulheres com CM invasivo sobrevivem aos cinco anos após o diagnóstico e 83% aos 10 anos subsequentes a intervenção (ACS, 2019). Quando o diagnóstico é tardio, o desenvolvimento de metástases e a resistência ao tratamento são desafios encontrados pela equipe médica no manejo do paciente.

A mamografia é a principal estratégia para a detecção precoce do CM. Mulheres a partir dos 40-45 anos de idade são aconselhadas a realizar estes exames e aquelas que apresentam um alto risco conhecido (mutação em *BRCA*; história familiar de CM e/ou câncer de ovário; radioterapia prévia; entre outros) recomenda-se a realização a partir dos 30-35 anos de idade conjuntamente com ressonância magnética (Saslow *et al.*, 2007; Oeffinger *et al.*, 2015). Estudos indicam uma redução de 30-40% das mortes por CM entre as mulheres que realizam a triagem por meio da mamografia (Marmot *et al.*, 2013; Coldman *et al.*, 2014; Paci *et al.*, 2014; Tabar *et al.*, 2019). No entanto, estima-se que 10-15% dos casos precoces acabam passando despercebidos pela mamografia levando a resultados falso-negativos. Além disso, a mamografia muitas vezes não é capaz de diferenciar lesões benignas de malignas sendo necessária a realização de biópsia tecidual. Atualmente, cerca de 12% das mulheres necessitam realizar mais exames de imagem e/ou biópsia, sendo que na maioria dos casos se constata uma lesão benigna ou ausência de alterações (Rghebi *et al.*, 2016; Lehman *et al.*, 2016).

O diagnóstico precoce se reflete nas taxas de sobrevivência assim como a identificação dos subtipos de CM é essencial no planejamento terapêutico possibilitando uma estratégia para cada caso visando a melhor resposta possível. Assim, diversos aspectos devem ser levados em consideração como idade, quadro geral de saúde, avaliação da IHQ, estágio do tumor, análise de linfonodo axilar, presença de mutações em genes importantes no CM (*BRCA1*, *BRCA2*, por exemplo), e análise de marcadores genômicos.

A análise de painéis de mutações somáticas colabora para o entendimento do CM individual. Alguns exemplos são o *Oncotype DX*TM (21 genes), *MammaPrint*TM (70 genes), ambos recomendados para tumores ER+ e/ou PR+, HER2-; e PROSIGNA[®]

ou PAM50 (50 genes) que predizem risco de recorrência além de indicar se há benefício ou não na adoção da quimioterapia adjuvante (Van De Vijver *et al.*, 2002; Paik *et al.*, 2004; Buyse *et al.*, 2006). Por fim, é importante discutir todos os benefícios e riscos associados independente da estratégia a ser abordada mediante as informações obtidas.

A cirurgia é uma importante abordagem terapêutica, que pode ser precedida ou não de quimioterapia (tratamento neoadjuvante). No momento da cirurgia, é realizada a remoção de alguns linfonodos axilares regionais (linfonodo sentinela) para a avaliação da presença de metástases, importante indicativo de risco de recorrência. Em seguida, conforme o caso, é indicado o tratamento adjuvante para auxiliar na redução do risco de recorrência uma vez que tem como objetivo a eliminação de células tumorais remanescentes não detectadas previamente (micrometástases). Tal conduta pode envolver regimes de radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal/endócrina, terapia alvo, e imunoterapia.

Em casos de tumores grandes, com alta taxa de proliferação e/ou metastático é indicado a realização de tratamento sistêmico antes da cirurgia (terapia neoadjuvante) cujo principal intuito é a redução da massa tumoral para a realização de uma cirurgia menos extensa. Tal escolha vem aumentando nos últimos anos principalmente entre pacientes TN e HER2+. Além disso, vem demonstrando efeito semelhante à terapia adjuvante em relação aos parâmetros de sobrevida e recorrência à distância (EBCTCG, 2018; Murphy *et al.*, 2018). Deve-se ressaltar que independentemente do plano de tratamento o objetivo é a redução do risco de recorrência e não sua completa eliminação (Visvanathan *et al.*, 2019; Burstein *et al.*, 2019).

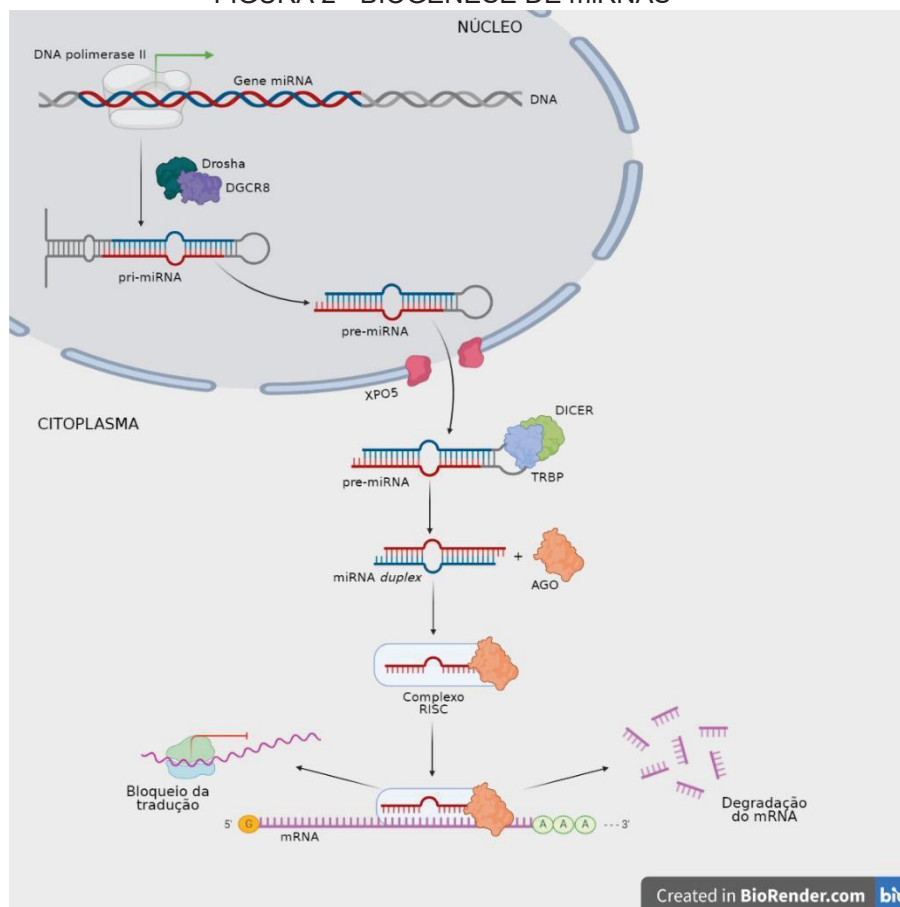
2.2 microRNAs NO CÂNCER DE MAMA

Além dos RNAs codificantes há os RNAs não codificantes como os RNAs longos não codificantes (lncRNA), microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNA do inglês *small interfering RNAs*), entre outros. Os ncRNAs são importantes atores celulares uma vez que atuam na regulação da expressão gênica e a alteração de seus níveis contribui para o processo tumoral (Slack e Chinnaiyan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Dentre eles, os miRNAs se destacam por atuarem na

regulação da expressão gênica por meio da interação com mRNAs interferindo no processo de tradução.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes com 18 a 25 nucleotídeos formados a partir da transcrição de seus respectivos genes pela DNA polimerase II no núcleo (FIGURA 2). O RNA transcrito dobra-se formando uma estrutura de *loop* em gancho, denominada miRNA primário (pri-miRNA) que é reconhecida e processada pelo complexo Drosha-DGCR8 que promove a clivagem das extremidades livres dando origem ao pré-miRNA. Essa molécula é exportada para o citoplasma por meio da exportina 5 (XPO5) onde o complexo DICER-TRBP retira a estrutura de *loop* criando uma dupla fita de RNA, o miRNA *duplex*. Em seguida as fitas são separadas (uma ou ambas) e associadas à proteína Argonauta (Ago) formando o complexo RISC (FIGURA 2). O miRNA maduro formado é guiado para interação direta com mRNAs alvos bloqueando sua tradução ou o direcionando para a degradação.

FIGURA 2 - BIOGÊNESE DE miRNAS



LEGENDA: pri-miRNA – miRNA primário; XPO5 – exportina 5; AGO – argonauta; mRNA – RNA mensageiro.
FONTE: A autora, criado no BioRender (2021)

Alterações na expressão dos miRNAs podem provocar a desregulação da expressão gênica e, por isso, estão associadas a diversas patologias, entre elas o câncer. Esse desbalanço da dinâmica celular pode provocar o aumento da expressão de genes que, geralmente, são menos expressos e vice-versa. Assim, os miRNAs parecem estar diretamente envolvidos na etiologia, progressão, metástase e prognóstico de diversos cânceres humanos, incluindo o CM e ganharam o foco de estudos sendo explorados como potenciais biomarcadores.

Em alguns exemplos de publicações recentes, Wu *et al.* (2021) observaram aumento da expressão do miR-30b-5p em tecido e linhagens de CM sugerindo um papel de promotor tumoral devido ao estímulo a migração e invasão e redução da apoptose. Além disso, confirmaram que a *ASPP2* é um alvo direto do miR avaliado propondo o eixo miR-30b-5p/*ASPP2*/AKT como uma estratégia terapêutica para tumores TN (Wu *et al.*, 2021). Já o miR-940 foi proposto como biomarcador de prognóstico por se mostrar associado com baixa taxa de sobrevida das pacientes com CM (Zhang *et al.*, 2020). O miR-223 pode ser utilizado na identificação de CDIS agressivos e como biomarcador preditivo de resposta terapêutica com inibidores de CDK4/6 (Citron *et al.*, 2020).

Outro aspecto de grande interesse é a possibilidade de identificação dos miRNAs circulantes (c-miRs), que podem estar livres (cf-miRs) ou dentro de vesículas extracelulares, passíveis de serem detectados em fluidos corporais (biópsia líquida). Ao estarem quantitativamente alteradas, essas moléculas são capazes de interferir na sinalização celular e contribuir para o desenvolvimento e progressão de tumores (Niedźwiecki *et al.*, 2018; Hetta *et al.*, 2019; Andersen e Tost, 2020). Além disso, a concentração de cf-miRs se mostra maior em comparação com mRNAs uma vez que, por estarem associados às proteínas argonautas ou lipoproteínas, são mais estáveis e permanecem por mais tempo nos fluídos mesmo diante de níveis elevados de RNases séricas observados em pacientes oncológicos (Arroyo *et al.*, 2011; Vickers *et al.*, 2011; Colombo e Raposo, 2014).

Os níveis extracelulares de alguns cf-miRs vem sendo relacionados com diversos tipos de câncer, como câncer de mama e próstata (Ozawa *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Zhao e colaboradores (2010) sugeriram, em um estudo piloto, que alterações nos níveis circulantes de miRNA podem ser usados como biomarcadores para o CM. Os miRNAs no contexto da biópsia líquida no câncer de

mama são amplamente abordados no Apêndice I, que consiste no artigo de revisão “*Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free microRNAs as biomarkers*” (Ozawa e Jucoski *et al.*, 2020).

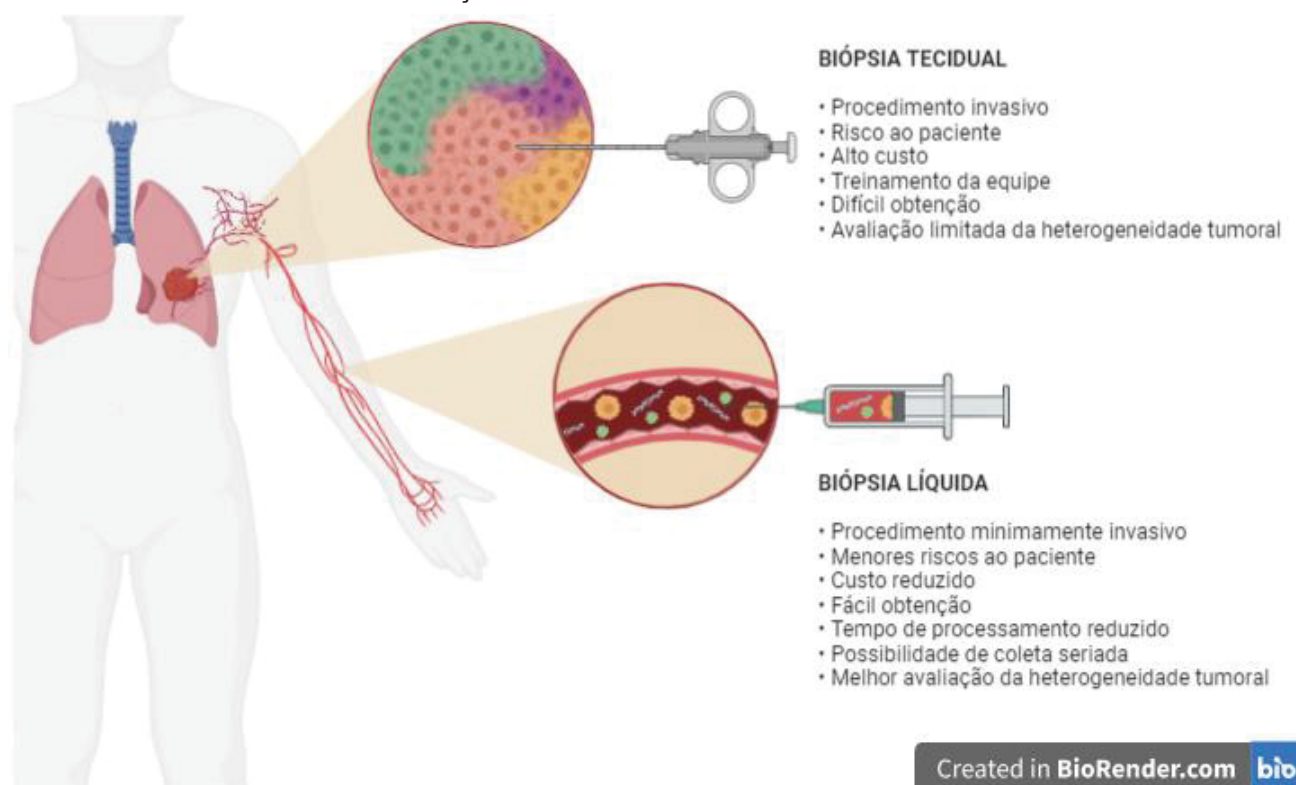
Diante da variedade de biomarcadores que demonstram potencial para uso na biópsia líquida em diversos tipos de câncer, fica evidente a dificuldade de encontrar apenas um ou alguns que sejam aplicáveis, sensíveis e específicos. Desse modo, a busca é pela produção e reunião de informações com o objetivo de elaborar painéis de moléculas circulantes ao invés de uma abordagem direcional com apenas uma molécula.

2.2.1 Biópsia Líquida

A biópsia tecidual, atualmente, é o padrão-ouro para avaliação tumoral. Nessa abordagem são coletadas amostras do tecido suspeito para análise histopatológica. Tal procedimento necessita de preparação do paciente e treinamento da equipe médica, ou seja, envolve altos custos além de conferir alguns riscos ao paciente por se tratar de um método invasivo. Após a coleta, as amostras são fixadas em formalina e colocadas em parafina para a análise patológica dificultando seu posterior uso em análises moleculares devido à degradação observada dos ácidos nucleicos presentes na amostra (Overman *et al.*, 2013; Marrugo-Ramírez *et al.*, 2018; De Rubis *et al.*, 2019; Fernades-Lárazaro *et al.*, 2020) (FIGURA 3).

A biópsia líquida consiste na análise de biomarcadores em fluídos corporais como sangue, saliva, urina, líquido, entre outros (Colombo e Raposo, 2014; Cree *et al.*, 2017; Foj *et al.*, 2017; Siravegna *et al.*, 2017). Deste modo, é vista como uma interessante alternativa à biópsia do tecido tumoral auxiliando na detecção, tomada de decisão e acompanhamento dos pacientes com câncer.

FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE BIÓPSIA TECIDUAL E BIÓPSIA LÍQUIDA



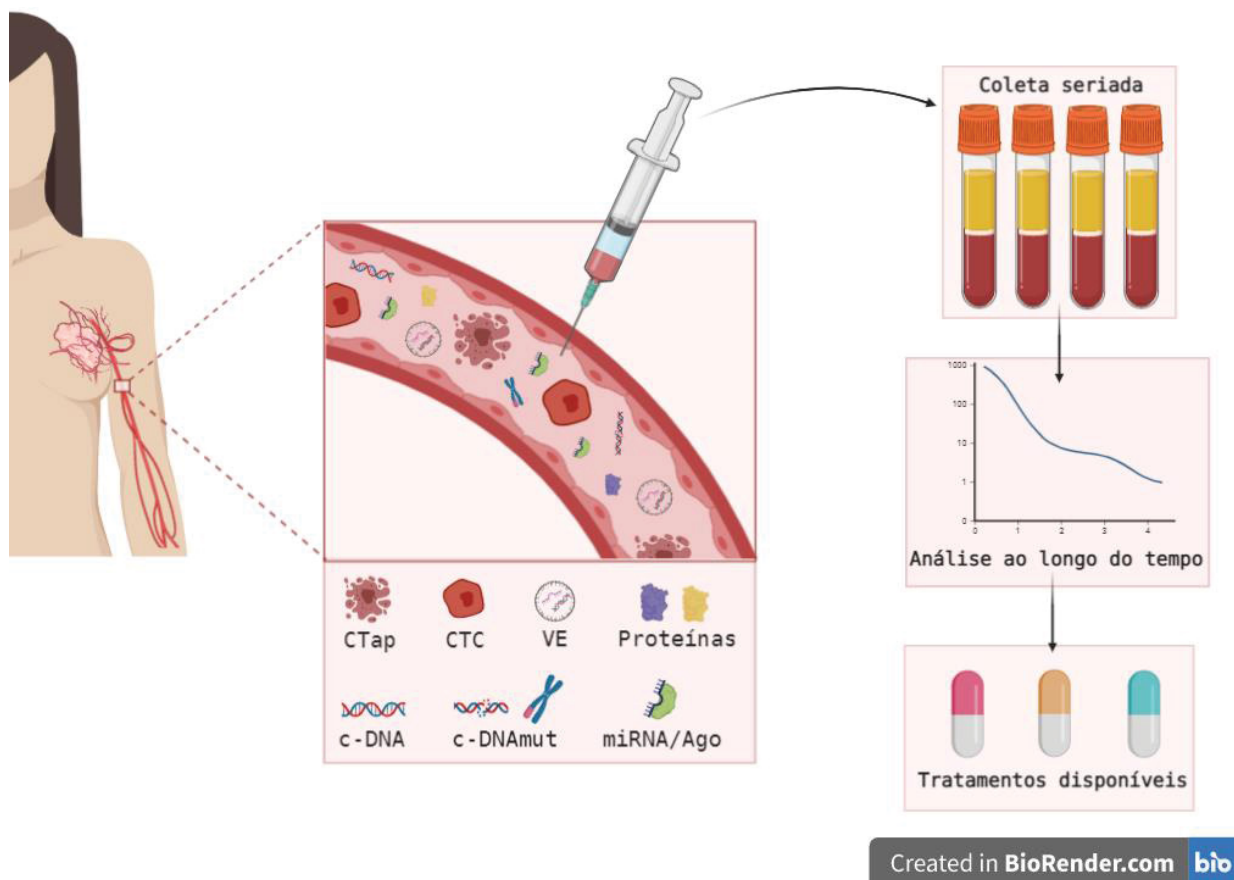
FONTE: A autora, criado no BioRender, 2021.

Por ser considerado um método minimamente invasivo, a biópsia líquida é vista como alternativa em situações específicas, por exemplo diante ao difícil acesso ao tumor (como cérebro, pulmão e pâncreas) ou quando o paciente está debilitado para a realização de nova coleta tecidual. Nessas circunstâncias, a utilização do sangue, por exemplo, cuja coleta já é rotina, pode trazer informações e, ao mesmo tempo, menor incomodo e complicações ao paciente. Diferentemente da biópsia tecidual em que a amostra é representativa do estado momentâneo da célula tumoral, os fluídos corporais permitem coleta seriada em curtos espaços de tempo possibilitando um acompanhamento mais próximo da dinâmica e evolução das alterações moleculares exibidas pelas células tumorais (Overman *et al.*, 2013; Siravegna *et al.*, 2017; Marrugo-Ramírez *et al.*, 2018; De Rubis *et al.*, 2019; Fernades-Lárazaro *et al.*, 2020) (FIGURA 3).

Além disso, agregar essa abordagem à rotina clínica complementa os resultados de exames padrões. Por possibilitar a coleta seriada em curtos espaços de tempo contribui, principalmente, para o manejo do paciente através da avaliação dos biomarcadores, sempre visando a melhora da sobrevida (FIGURA 3).

O emprego da biópsia líquida permite a avaliação de três principais grupos de biomarcadores no contexto do câncer: as células tumorais circulantes (CTCs); as vesículas extracelulares (VEs) e os ácidos nucleicos livres (cf-NAs; do inglês *cell-free nucleic acids*) (FIGURA 4), além das plaquetas “ensinadas/educadas” pelo tumor (TEP; do inglês *tumor-educated platelets*), não contempladas na figura, mas foco de muitos estudos.

FIGURA 4 - BIÓPSIA LÍQUIDA EM CÂNCER.



LEGENDA: CTC – célula tumoral circulante; CTap – célula tumoral em apoptose; VE – vesícula extracelular; miRNA – microRNA; Ago – proteína argonauta; c-DNA – DNA circulante; c-DNAmut – DNA circulante mutado.

FONTE: A autora, criado no BioRender, 2020.

2.3 ENSAIOS FUNCIONAIS

A compreensão da regulação da expressão gênica por meio dos miRNAs vem sendo cada vez mais explorada por meio da realização de estudos funcionais. Essa abordagem visa validar dados obtidos em estudos de expressão gênica em grandes coortes e metanálises.

A utilização de moléculas que mimetizam (*mimic*) ou inibem o miRNA alvo em linhagens celulares possibilita sua modulação contribuindo para o entendimento de seu efeito sobre características tumorais importantes como proliferação, apoptose, migração e invasão. Além disto, contribui para a exploração da interação entre miRNAs e mRNAs alvos muitas vezes apenas preditos *in silico*.

As moléculas mimetizadoras são modificadas quimicamente para imitar os miRNAs maduros endógenos, elevando a quantidade de miRNA disponíveis na cultura de células e gerando uma regulação negativa da tradução de seus mRNAs alvos devido à interação física. Em contrapartida, as moléculas inibidoras apresentam uma estrutura secundária modificada sendo capazes de se ligar especificamente ao miRNA de interesse atuando como esponjas e promovendo seu silenciamento. Desse modo, uma regulação positiva dos mRNAs alvos ocorre uma vez que não são inibidos ou degradados pelo miRNA em modulação, seguindo o processo de tradução (Lim *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Thomson *et al.*, 2013; Yoo *et al.*, 2017).

A inserção dos mimetizadores e inibidores nas linhagens celulares ocorre por meio da transferência gênica que pode utilizar vetores virais e não virais. O primeiro método utiliza retrovírus, adenovírus ou lentivírus como vetores uma vez que esses são capazes de transferir seu conteúdo para uma célula hospedeira. Já a transfecção gênica é o método sem uso de vírus e tem como princípio a utilização de, por exemplo, fosfato de cálcio e lipossomas catiônicos. Tais agentes possibilitam a entrada das moléculas em estudo nas células por meio da membrana plasmática.

A modulação da expressão de miRNAs em linhagens celulares tem por objetivo o estudo do efeito do aumento ou supressão da expressão do mRNA associado ao ganho ou perda de função, respectivamente. O ganho ou perda de função, por sua vez, oportuniza a avaliação do comportamento das células tumorais em cultura, em

especial das características reconhecidamente adquiridas pelas células tumorais, como proliferação, capacidade de invasão, de formação de colônias, entre outras.

Gorur *et al.* (2021) observaram que a restauração da expressão do miR-22-3p em linhagens TN (MDA-MB-231 e MDA-MB-436) promoveu a redução da proliferação, migração, invasão e formação de colônias sugerindo um papel de supressor tumoral. Ainda observaram a interação direta do miR-22-3p com o mRNA eEF2K, um alvo predito, e propuseram um esquema de terapia baseada em RNAs não codificantes. Evangelista *et al.* (2021) utilizaram o silenciamento para avaliar os efeitos do miR-210 em linhagem TN (MDA-MB-231) e relataram aumento da proliferação, sugerindo mRNAs alvos por meio de análises *in silico*. Além dessas abordagens, os ensaios funcionais também desempenham importante papel na avaliação de biomarcadores em biópsia líquida. Em trabalho anterior do nosso grupo, Ozawa *et al.* (2018) observaram um aumento da proliferação e da resistência a agentes terapêuticos na linhagem MCF10A tratada com vesículas extracelulares provenientes da linhagem triplo negativa HCC1806, chamando a atenção para a possível atuação de miRNAs circulantes.

O efeito funcional e mecanismos moleculares de ação entre miRNAs e mRNAs apesar de bastante explorado nas últimas décadas ainda apresenta muito a ser estudado. Essa metodologia se tornou uma potente ferramenta na avaliação dos miRNAs na regulação da expressão gênica possibilitando a identificação de relações chaves para o entendimento do desenvolvimento e progressão tumoral, ou seja, no estabelecimento de potenciais biomarcadores. Essa abordagem se mostra eficaz também na identificação de moléculas e vias alvos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Em estudo proteômico realizado anteriormente pelo nosso grupo foi proposta, a partir de análises *in silico*, uma relação entre o miR-146a-5p e a proteína catalase (CAT) em tecidos tumorais mamários (Gomig *et al.*, 2019). Nesse contexto, a realização de ensaios funcionais para explorar a relação miRNA-mRNA se torna essencial.

Portanto, a produção de informações nessa área é de grande valia para contribuir com a compreensão de uma doença complexa como o câncer.

3. OBJETIVO

Diante do exposto, fica evidente a importância dos miRNAs tanto como reguladores chave na etiologia e progressão tumoral, bem como da potencialidade deles terem seus níveis desregulados na circulação e serem biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e de resposta a terapia no CM. Sendo assim, este trabalho se destina a contribuir nestas duas linhas de investigação: i) selecionando através de bancos de dados públicos de tecido tumoral e não tumoral, miRNAs diferencialmente expressos e avaliando a potencialidade de um conjunto destes estarem também desregulados no plasma de mulheres com CM e, ii) investigando o efeito funcional de um miRNA selecionado a partir da primeira análise e também de dados anteriores do grupo, contribuindo com o entendimento da patogênese do carcinoma mamário e com a possibilidade de novos alvos terapêuticos. Portanto, os objetivos deste trabalho são:

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de miRNAs selecionados como biomarcadores circulantes no câncer de mama e sugerir possíveis mecanismos de atuação na tumorigênese.

3.2 Objetivos específicos

1. Análise da expressão diferencial de miRNAs em tecido mamário entre pacientes e controles, entre os subtipos moleculares e imunoistoquímicos de câncer de mama e de acordo com parâmetros prognósticos, através de análise dos dados depositados no “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA);
2. Quantificação dos miRNAs selecionados (miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p) em plasma de pacientes e controles e em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos; para avaliação do potencial uso como biomarcador circulante;
3. Avaliar o impacto funcional da modulação de um dos miRNA (miR-146a-5p) em linhagens celulares de câncer de mama através da realização de estudos funcionais para explorar seu papel na tumorigênese mamária;

4. Avaliar a expressão proteica da catalase (alvo predito do miR-146a-5p) em linhagens celulares de câncer de mama após modulação do miRNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto intitulado “Identificação de biomarcadores por métodos não invasivos em portadores de câncer esporádico” no qual o presente trabalho faz parte, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número CAAE: 67029617.4.0000.0102 em 26/04/2017.

4.2 Seleção de miRNAs candidatos

A seleção dos miRNAs candidatos ao estudo de expressão diferencial em plasma de pacientes com CM por RT-qPCR foi realizada através da análise de dados presentes na base *online The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Portanto, parte dos resultados aqui apresentados são baseados em dados gerados pela Rede de Pesquisa do TCGA (www.cancer.gov/tcga). A análise teve por objetivo selecionar miRNAs com potencial aplicabilidade clínica como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no CM. Essa etapa foi realizada com a colaboração do pesquisador Fábio Albuquerque Marchi do Centro Internacional de Pesquisa do A. C. Camargo Cancer Center (São Paulo, SP).

A seleção foi desenvolvida a partir da análise de dados de sequenciamento de amostras de tecido de CM contidos no TCGA e que já foram relatados como alterados no tumor de mama para a investigação destes no plasma. Para isso duas matrizes de dados foram acessadas através da plataforma UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/> - BRCA: Illumina Hiseq, TCGA Hub): “*Phenotypes*” e “*IlluminaHiseq*”. A primeira matriz contém informações clínicas das pacientes sendo a base para a seleção dos grupos de amostras, e a segunda matriz apresenta os dados de RNA-Seq de miRNAs (FIGURA 6).

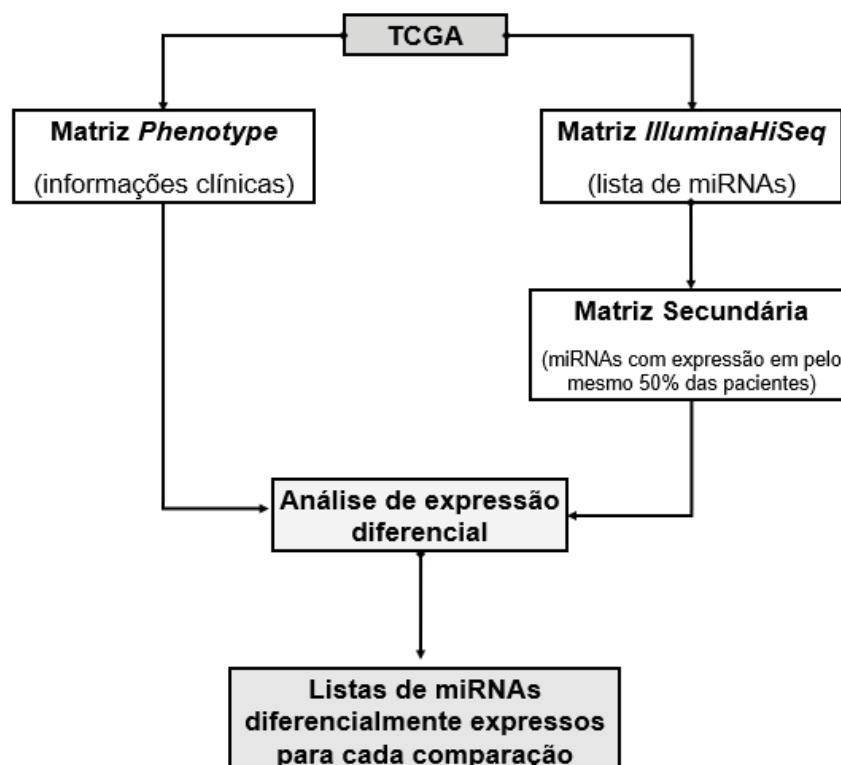
O primeiro passo foi o tratamento dos dados da matriz “*IlluminaHiseq*” para uma filtragem inicial de miRNAs. Essa etapa é necessária para seleção daqueles miRNAs com mais dados apresentados uma vez que nem todas as pacientes têm informações para todos os miRNAs listados originalmente. Nessa etapa foi gerada uma nova matriz

contendo aqueles miRNAs que apresentavam dados para pelo menos 50% das pacientes a partir dos seguintes parâmetros: valor de p ajustado $< 0,05$ e FDR (*False Discovery Rate*) $< 0,01$ (FIGURA 5).

Em seguida para filtragem e definição dos miRNAs foram realizadas as seguintes análises dentro dos subtipos moleculares e imunoistoquímicos previamente definidos:

- 1- Valor de *fold change* (FC) considerando miRNAs com maior expressão a partir de $FC \geq 2$ e redução da expressão a partir de $FC < -2$;
- 2- Análise das características clínicas e histopatológicas considerando-se os miRNAs candidatos com $p < 0,05$;
- 3- Análise de predição de alvo pelas ferramentas *online* miRanda (<http://www.microrna.org/>), miRcode (<http://www.mircode.org/>), microT-CDS v.5.0 (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index), miRDB (<http://www.mirdb.org/>), miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), Rfam (<https://rfam.xfam.org/>), Starbase (<https://starbase.sysu.edu.cn/>), TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) e TarBase v.7.0 (Vlachos *et al.*, 2014).

FIGURA 5 - ESQUEMA DAS ETAPAS DA ANÁLISE DOS DADOS DO TCGA PARA SELEÇÃO DE miRNAs.



A seleção de miRNAs candidatos se deu a partir de matriz dos dados clínicos das pacientes (Phenotypes) e da matriz dos dados de RNA-Seq (IlluminaHiSeq). Essa segunda foi inicialmente tratada, permanecendo aqueles miRNAs que tinham informações para, pelo menos, metade das pacientes. Em seguida, essas pacientes foram divididas entre os subtipos moleculares e imunoistoquímicos de câncer de mama para a realização da análise de expressão diferencial gerando listas de miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos comparados.
FONTE: A autora (2021)

Os miRNAs selecionados na etapa de análise *in silico* foram investigados na literatura, assim como em dados gerados em trabalhos anteriores produzidos pelo nosso grupo de pesquisa. A presença do miR em trabalhos anteriores do grupo foi valorizada, uma vez que as amostras a serem testadas seriam da mesma população. A partir disso, foram selecionados três miRNAs: miR142-5p; miR-146a-5p e miR-150-5p. Além disso, esses foram realizadas análises de vias KEGG (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e *Gene Ontology* (GO) por meio da plataforma DIANA-miRPath.

Os miR-150-5p e miR-142-5p foram estudados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em exossomos provenientes do soro de pacientes com CM (Ozawa *et al.*, 2020). Além disso, estudos de proteômica, também desenvolvido em nosso laboratório, identificaram algumas proteínas, entre elas a catalase (CAT), como preditas para alvos do miR-146a-5p (Gomig *et al.*, 2019).

4.3 Caracterização da amostra

No presente estudo foram utilizadas amostras de plasma de 43 pacientes do sexo feminino portadoras de câncer de mama, sendo 28 luminal A e 15 triplo negativo, além de 19 amostras controle provenientes de mulheres sem a doença. As informações das pacientes foram obtidas a partir dos respectivos prontuários e laudos anatomopatológicos sendo os dados de imunoistoquímica utilizados para a determinação dos subtipos de câncer de mama, de acordo com Goldhirsch *et al.* (2013). As principais características clínico-histopatológicas como idade, Ki-67, tamanho do tumor, classificação histológica, presença ou ausência de metástase em linfonodo axilar, grau histológico e regime quimioterápico estão contidos na TABELA 1.

Os critérios de inclusão adotados para as pacientes com carcinoma primário de mama foram: ter diagnóstico anatomopatológico positivo para a doença; não apresentar história familiar de câncer de mama ou outra síndrome de câncer hereditário. Os critérios de exclusão foram: apresentar alguma outra doença ativa que pudesse interferir na participação do indivíduo no estudo e mulheres gestantes ou em período de amamentação.

Os critérios de inclusão adotados para os indivíduos de controle foram: ter mais de 50 anos de idade; não ter histórico pessoal nem familiar de neoplasia; não fazerem uso de medicamento que possa afetar o sistema imunológico. Os critérios de exclusão foram: ter ou ter tido algum tipo de tumor, mulheres gestantes ou em período de amamentação.

TABELA 1 - DADOS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

	LA	TN
<i>N</i>	28	15
<i>Mediana da idade</i>	61,5 ± 13,8	53 ± 17,4
<i>Ki-67</i>		
Baixo (≤ 14%)	28/28	1/15
Alto (> 14%)	0/28	12/15
Sem informação	--	2/15
<i>Tamanho do tumor</i>		
≤ 20mm	23/28	8/15
> 20mm	5/28	2/15
Sem informação	--	5/15
<i>Classificação histológica</i>		
Ductal invasivo	16/28	8/15
Lobular invasivo	1/28	0/15
Outros†	10/28	7/15
<i>Linfonodo axilar metastático</i>		
Positivo	3/28	5/15
Negativo	24/19	8/15
Sem informação	1/28	2/15
<i>Grau histológico</i>		
I	8/28	0/15
II	18/28	1/15

III	1/28	8/15
Sem informação	1/28	6/15

LEGENDA: LA = luminal A; TN = triplo negativo; N = número de todos os pacientes incluídos nesse estudo; (--) não se aplica; (†) inclui os tipos carcinoma mucinoso, carcinoma tubular, carcinomas mistos.

4.4 Processamento de amostras de plasma

As pacientes e controles foram contatados por meio da equipe médica do Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, PR) ou membros do LabCHO. Todos os participantes que se voluntariaram, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1), foram submetidos à coleta de sangue. Amostras de sangue periférico, de pacientes foram coletadas antes da cirurgia e dos controles no momento do aceite, em tubos BD *vacutainer*[®] contendo EDTA e processadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para a obtenção do plasma. O protocolo consiste em centrifugar a amostra de sangue a 700g por 10 minutos para a separação das células sanguíneas e do plasma. Em seguida o sobrenadante, referente ao plasma, foi centrifugado a 2000g por 10 minutos a 4°C para evitar contaminações e enriquecer o plasma com os cf-RNAs circulantes (Duttagupta *et al.*, 2011). Em seguida, as amostras devidamente codificadas foram armazenadas em freezer -80°C.

4.5 Extração de RNA total

Para a realização da extração de RNA, utilizou-se 200 µl plasma e com o reagente Trizol LS (#10296028 - Thermo Fisher) seguindo protocolo do fabricante. Além disso, foi adicionado 0,75 µl (0,025 pmol) de *spike-in control* cel-miR-39 (Qiagen, DE) como controle exógeno. As amostras foram eluídas em 20 µl de volume final.

Além disso, foram realizadas extrações de RNA de 10 linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, CAMA, ZR-75-1, T47D, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e HCC1806) e duas linhagens consideradas não

tumorais (MCF-10A e 184B5) a partir de *pellet* de células por meio do protocolo com o reagente Trizol.

A quantificação de RNA total foi realizada no espectrofotômetro *Nano Drop2000*[™] (*Thermo Scientific*, USA) com posterior armazenagem em freezer -80°C.

4.6 Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (RT-qPCR)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada através do *TaqMan microRNA Reverse Transcription kit* (*Applied Biosystem*) de acordo com o protocolo já estabelecido no laboratório para a produção de cDNA por meio da enzima transcriptase reversa dos miR-142-5p, miR-146a-5p, miR-150-5p e o controle exógeno cel-miR-39.

Para uma reação foi utilizado 10 ng de RNA, 10 µl do *reverse transcription buffer 10x*, 1,5 µl da enzima transcriptase reversa, 0,5 µl do ensaio de transcrição reversa de cada um dos miRNAs avaliados, 0,25 µl de inibidor de RNase, 0,25 µl de dNTPs (100mM), completando com água para um volume de final de 20 µl. O equipamento Mastercycler Gradient (*Eppendorf*) foi utilizado para a realização dessa etapa por meio do seguinte esquema de ciclagem: 10 minutos a 25°C; 2 horas a 37°C; 5 minutos a 85°C; *hold* a 4°C.

As reações de PCR em tempo real (qPCR) para a quantificação dos miRNAs (miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p) foram realizadas com ensaios TaqMan® (ID assay: 002248, 000468 e 000473, respectivamente - Applied Biosystems), usando o cel-miR-39 como controle exógeno/gene de referência (ID assay:0002000) e a linhagem BT474 como amostra calibradora. As reações foram realizadas em placas de 384 poços (Applied Biosystems) com volume final da reação de 10 µl, sendo 5 µl do TaqMan Universal Master Mix No UNG (Applied Biosystems), 0,5 µl do respectivo ensaio TaqMan® e 4,5 µl de amostra de cDNA diluída 1:5.

O equipamento utilizado foi o *Vii7 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*[™]) com o programa de ciclagem da Tabela 2.

TABELA 2 - PROGRAMA DE CICLAGEM DE qPCR

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
50°C	5 minutos	1x
95°C	10 minutos	1x
95°C	15 segundos	45x
55°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	

4.7 Ensaios funcionais do miR-146a-5p

4.7.1 Cultivo celular

O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do Departamento de Genética da UFPR. Considerando que a maioria dos estudos funcionais sobre miR-146a-5p foi realizada em linhagens triplo negativas, como a MDA-MB-231, utilizamos a MCF-7, classificada como luminal A, para estabelecermos comparações entre os resultados.

As células foram cultivadas e mantidas em meio DMEM (do inglês, *Dulbecco Modified Eagle Medium*) (Gibco, UK) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (Gibco, USA) em incubadora estéril a 37°C e com 5% de CO₂ (UltraSafe). As células foram cultivadas inicialmente em garrafas de 25 cm² (CellStar®, Greiner Bio-One) com 5 mL de meio DMEM e, posteriormente transferidas para garrafas de 75cm² (CellStar®, Greiner Bio-One) com 10 mL de meio DMEM. Após atingir a confluência de cerca de 80%, foi utilizada solução de tripsina (Sigma-Aldrich) para promover a desagregação das células da parede da garrafa. Em seguida, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer para posterior utilização nos ensaios funcionais.

4.7.2 Contagem de células em câmara de Neubauer

As células, após tripsinizadas, foram contadas na câmara de Neubauer ou hemocítômetro. Para isso, 10 µl de células ressuspendidas e 40 µl de solução de PBS foram utilizadas para realizar a diluição inicial para contagem. Em seguida, 10 µl foram adicionados à câmara. A contagem de células se deu nos quatro quadrantes presentes na câmara e o cálculo da quantidade presente na garrafa foi realizada de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Número de células por mL} = M \times \text{FD} \times A$$

Sendo: M = média do número de células nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer

FD = fator de diluição adotado

A = área da câmara (10.000)

Assim, obteve-se a quantidade de células por mL. Após contagem, foram realizadas diluições de acordo com a quantidade de células necessárias para cada ensaio funcional.

4.7.3 Transfecção do miR-146a-5p na linhagem MCF-7

O processo de transfecção compreende a inserção de ácidos nucleicos em células em cultivo celular. Neste trabalho, o procedimento compreendeu o uso de uma molécula mimetizadora (*mimic*) do miR-146a-5p (mirVana – MC10722, Ambion, USA) e uma molécula como controle negativo (mirVana – miRmimic Negative Control #1, Ambion, USA). O *mimic* é uma molécula sintética semelhante à de interesse que irá mimetizar sua função dentro da célula, ou seja, nesse caso teremos o aumento da expressão da molécula estudada. Como controle, é utilizada uma molécula de sequência randômica, porém com estrutura semelhante ao alvo estudado, que não afeta sua expressão celular.

O reagente lipofectamina™3000 (Invitrogen) foi utilizado com o objetivo de aumentar a eficiência da reação de transfecção uma vez que contém subunidades lipídicas que, em ambiente aquoso, formam lipossomos apreendendo o RNA a ser

transfectado. Assim, tais complexos são capazes de se fundir a membrana plasmática da célula permitindo a entrada de seu conteúdo no citoplasma.

Inicialmente foi realizada a ressuspensão do *mimic* miR-146a-5p e controle negativo (CT-). Para isso, os tubos foram centrifugados a 980 g por 5 minutos e, posteriormente, adicionados 50 µl de água para preparo da solução estoque com concentração de 100 pmoles/µl. Essa solução foi congelada por, no mínimo, 24h a -20°C. No dia seguinte, a alíquota para uso foi preparada, diluindo 5 µl da solução estoque em 45 µl da água para ressuspensão. Desse modo, obteve-se uma alíquota na concentração de 10 pmoles/µl.

Em uma placa de seis poços (CellStar – Greiner Bio-One) foram adicionadas cerca de 600.000 células/poço. Para isso as células MCF-7 em cultivo foram tripsinizadas, ressuspendidas, contadas e diluídas, em meio DMEM sem antibiótico, para que em 250 µl houvesse, aproximadamente, 600.000 células. Nessa etapa, foi utilizado o meio DMEM sem antibiótico, pois na presença de lipofectamina os antibióticos conseguem adentrar em maior quantidade nas células podendo promover uma redução da viabilidade celular.

A reação de transfecção, por poço, seguiu o seguinte protocolo:

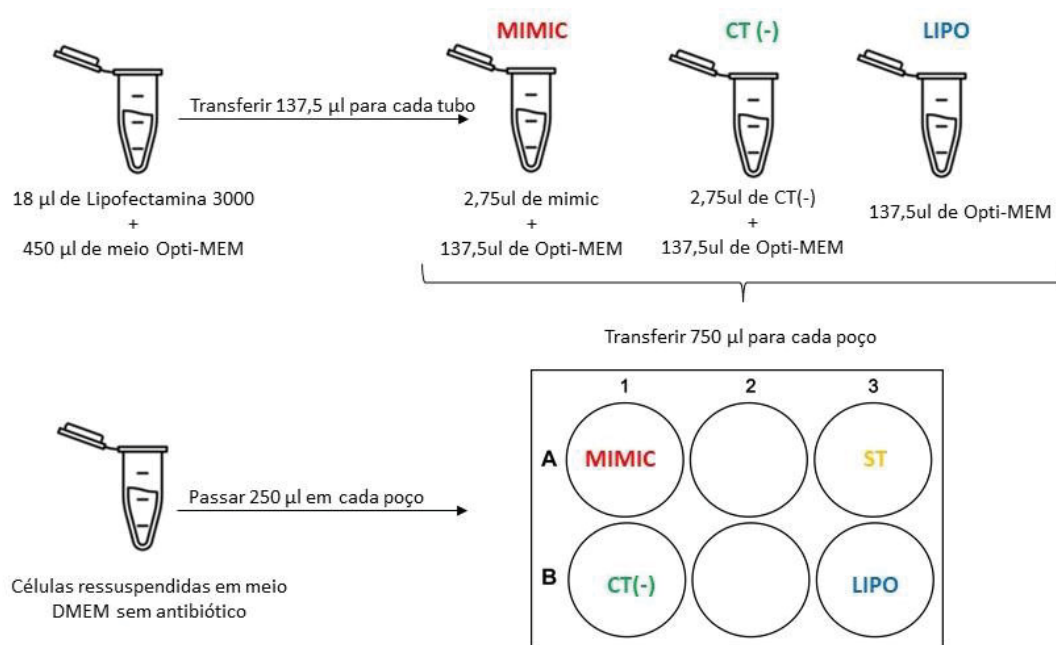
1. 2,5 µl do *mimic* miR-146a-5p ou do CT- diluídos em 125 µl de Opti-MEM e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente;
2. 5 µl de lipofectamina™3000 diluídos em 125 µl de Opti-MEM e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente;
3. ambos os tubos foram reunidos (*mimic* ou CT- + Lipofectamina/Opti-MEM) e 750 µl adicionados em cada poço (figura 6).

A placa foi montada com quatro poços sendo um para o *mimic* miR-146a-5p; CT-; controle da lipofectamina (apenas lipofectamina e Opti-MEM); e um poço sem tratamento (apenas com as células em DMEM) (ANEXO 2).

Essa abordagem em que as células são adicionadas juntamente com os reagentes se chama transfecção reversa e necessita de, pelo menos, 4h em incubadora estéril (37°C e 5% de CO₂) para possibilitar o processo de transfecção (incorporação do *mimic* ou CT-) e adesão das células na placa. Após esse tempo, em microscópio óptico invertido, se verifica a adesão celular e, então, retira-se o sobrenadante e adiciona-se o meio DMEM completo (com antibióticos) (ANEXO 2).

As células foram coletadas após 48 e 72 horas de transfecção, para a realização da extração do RNA por Trizol e confirmação por RT-qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

FIGURA 6- ESQUEMA DE TRANSFECÇÃO DO miR-146a-5p MIMIC NA LINHAGEM MCF-7



Inicialmente as células foram ressuspensas, contadas e diluídas, em meio DMEM sem antibiótico, para que em 250 µl houvesse, aproximadamente, 600.000 células, número a ser adicionado em cada poço da placa. A transfecção envolve uma primeira etapa de diluição da Lipofectamina em meio Opti-MEM, assim como do *mimic* e do controle negativo. Em seguida, 137 µl da Lipofectamina 3000 diluída é adicionada aos demais tubos. Por fim, são colocados 750 µl de cada em seus respectivos poços na placa. Os cálculos aqui apresentados foram realizados levando-se em consideração o uso de quatro poços. Assim, os valores apresentados no esquema podem variar. Mais detalhes no protocolo descrito no ANEXO 2

LEGENDA: CT- – controle negativo; LIPO – Lipofectamina; ST – sem tratamento; µl – microlitro.

FONTE: A autora (2021)

4.7.4 Ensaio de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada a partir do reagente Resazurina (R7017-1G; Sigma Aldrich), um método colorimétrico capaz de determinar o número de células metabolicamente ativas, permitindo medir a taxa de proliferação e

viabilidade celular. Para isso, 0,05g de Resazurina foi diluído em 200 mL de PBS 1x para se obter a concentração de 0,25 mg/μl e alíquotas de 1 mL foram armazenadas a -20°C.

As células ativas são capazes de metabolizar o reagente resazurina produzindo o composto resafarina que apresenta coloração rosa e é fluorescente. Assim, diante do aumento do número de células viáveis metabolicamente há aumento da atividade global de desidrogenases mitocondriais na amostra avaliada. Essas enzimas são responsáveis pela conversão citada acima gerando diferenças na absorbância da solução. A leitura da absorbância apresenta um padrão de coloração que foi detectado em leitor de placa a 570nm com onda de referência de 600nm.

Para o ensaio de viabilidade, aproximadamente 2.000 células/poço foram adicionadas em placas de 96 poços (Cell Star – Greiner BioOne) para a avaliação da viabilidade nos tempos de 48, 72 e 96 horas. As placas foram montadas com três grupos de amostras em quintuplicata: o controle da reação com apenas meio DMEM; células transfectadas com *mimic* miR-146a-5p; e células transfectadas com o CT-.

A cada intervalo de tratamento, ou seja, a cada 24h foi adicionado 10μL de resazurina que correspondia a 10% do volume do poço de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as placas foram novamente incubadas por 4 horas em estufa estéril (37°C e com 5% de CO₂) (ANEXO 3).

A absorbância foi lida em leitora de placa no Departamento de Bioquímica da UFPR (SynergyLX - BioTek). Os valores de absorbância obtidos nas amostras transfectadas com o *mimic* miR-146a-5p foram comparados com os apresentados pelas amostras transfectadas com o CT- devidamente normalizadas pelo controle da reação.

4.7.5 Ensaio de Capacidade Clonogênica

O ensaio de capacidade clonogênica, ou de formação de colônias, avalia a capacidade de uma célula crescer e formar colônias (conjunto de mais de 50 células) (Puck e Marcus, 1956; Franken *et al.*, 2006).

Após a realização da transfecção, cerca de 500 células foram adicionadas em placas de seis poços com adição de 2 mL de meio DMEM completo sendo mantidas

em estufa estéril (37°C e 5% de CO₂) por 15 dias, tempo no qual as colônias se tornaram visíveis a olho nu. Diante disso, o composto cristal violeta (CV) foi utilizado para a coloração e contagem. Inicialmente o meio foi retirado dos poços e esses lavados duas vezes com PBS 1x (37°C), em seguida as células foram fixadas com 500 µl de metanol absoluto, novamente lavadas com o PBS 1x, e então coradas com 1mL de CV e contadas (ANEXO 4)

4.7.6 Ensaio de Apoptose

O método de marcação com anexina (anexV) e iodeto de propídeo (PI) foi adotado para a análise da taxa de morte celular por apoptose e necrose nas células MCF-7 transfectadas por meio da avaliação da fosfatidilserina (FS) que, em condições normais, está presente na parte interna da membrana plasmática. Células em processo de apoptose sofrem uma desorganização em sua membrana que leva a um rearranjo da FS que passa a ser expressa na parte externa da membrana plasmática. Levando em consideração essa reorganização, a anexina V se liga com alta afinidade a FS, ou seja, é capaz de marcar as células em processo de apoptose. Em contrapartida, o PI auxilia na distinção entre células apoptóticas e necróticas uma vez que é um intercalante de DNA. Assim, quando detectado indica que houve um dano na membrana plasmática e que o DNA ficou mais exposto para sua interação, sugerindo a morte por necrose.

As células foram transfectadas em placas de seis poços e após 48h o sobrenadante foi coletado e as células aderidas foram tripsinizadas em tubos para citometria. A análise em citômetro de fluxo (BD FACSVerse™) foi realizada com o kit *Alexa Fluor™ 488 Annexin V / Dead Cell Apoptosis* (Invitrogen, USA). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de reação *Biding Buffer* 1x e, em sequência, adicionados 5 µl de anexina V e 1 µl de solução de PI (100 µg/mL), seguido por incubação de 15 minutos em gelo (ANEXO 5). Após esse período, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo para identificação e caracterização da população de células e estabelecimento dos parâmetros de voltagem, seguido da leitura das amostras.

4.7.7 Ensaio de Migração

O ensaio de migração celular por *scracth* ou *wound healing* foi realizado para avaliar a capacidade migratória das células após a transfecção. Para isso, foram adicionadas 35.000 células/poço em placas de 96 poços. Após 24h as células aderiram e foram tratadas com o reagente mitomicina C (20 µg/mL). A adição desse reagente é importante para a paralização do ciclo celular e, conseqüentemente, da proliferação sendo necessário mantê-las em estufa por 2h. Posteriormente um risco foi realizado no centro dos poços com ponteiras de 10 µl (ANEXO 6) seguido de duas lavagens com DMEM a 37°C para a retirada das células desprendidas e por fim foram adicionados 100 µl do meio. A área sem células foi avaliada por microscópio óptico invertido com câmera acoplada do Departamento de Biologia Celular da UFPR e analisadas no *software* Tscratch.

4.8 Western blotting

A avaliação da expressão proteica da proteína catalase foi realizada através do método *Western Blotting* (WB). Essa técnica consiste na detecção de proteínas específicas em amostras de lisados ou tecidos celulares.

A partir do botão de células da linhagem MCF-7 (aproximadamente 1×10^6 células) foi realizada a extração e solubilização de proteínas por meio do tampão de lise Triton 1% (pH 8.0) que é composto por 20mM de Tris, 137 mM de NaCl, 1% de triton, 2 mM de EDTA e inibidor de protease (PMSF). O botão de células, previamente coletado, foi centrifugado a 800 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado para eliminação de resquícios do meio de cultivo. Em seguida, adicionou-se 100 µl do tampão de triton 1% para ressuspensão das células que foram incubadas em gelo por 15 minutos. Após isso, foi realizada a centrifugação da amostra em 10.000g por 20 minutos a 4°C para a separação do conteúdo proteico dos demais componentes celulares. Portanto, ao final, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo devidamente identificado e seguiu para a quantificação pelo método do triptofano.

A quantificação proteica foi realizada através do método de curva padrão de triptofano (Wiśniewski, 2015) e lidas a uma absorbância de 350nm em um leitor de

ELISA no Departamento de Biologia Celular da UFPR. Essa reação envolve a utilização de 198 µl do tampão de amostra (Ureia 8 M, Tris-HCl 2.5 M e água ultrapura) adicionados a 2 µl de amostra para um volume final de 200 µl por poço da placa *low bind* a ser usada. As concentrações foram determinadas baseadas em uma curva padrão (0 - 5mg/mL).

O WB foi utilizado para a separação eletroforética das proteínas totais em géis de acrilamida de 1,5 mm. Para isso foi preparado o gel de corrida (*lower gel*) a 12% utilizando-se 3,3 ml de H₂O destilada, 4 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida a 30%, 2,6 ml de *Lower Buffer* (Tris-HCl 1,5 M (pH 6.8), 10% de SDS e água destilada), 100 µl do agente catalizador APS 10% (Persulfato de Amônio) e 8µl TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina) adicionados por último para a polimerização do gel. O gel de empilhamento (*upper gel*), foi preparado utilizando-se 2,1 ml de água destilada, 500µl de solução acrilamida/bis-acrilamida 30%, 410 µl de *Upper Buffer* (Tris-HCl 1 M (pH 6.8), 10% de SDS e água destilada), 30 µl de APS 10% e 6 µl TEMED, adicionados logo antes da aplicação. Assim, as amostras e o marcador de peso molecular foram preparados utilizando-se tampão redutor e aplicadas em gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) em sistema vertical de eletroforese (Bio-Rad, USA) durante 1:30h, a 100V.

O tampão de corrida 1x (solução 10x: 25 mM Tris, 190 mM de glicina, 0,1% de SDS e água destilada) foi adicionado na cuba assim como o marcador de massa molecular e as amostras aplicadas, sendo utilizado 1,5 µl do marcador de massa molecular (*PageRuler™ Protein Ladder*, #26616, *Thermo Scientific*) e 65 µg de cada amostra. A corrida do gel foi realizada a 100 V por aproximadamente 1h30.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana Amersham Protran Premium 0.2 de nitrocelulose (GE Healthcare Life Science, UK) por 2h, no sistema *trans-blot* (Bio-Rad, USA). Em seguida, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) e lavada 3x com tampão TBST 1x (*Tris Buffered Saline with Tween® 20*) com o objetivo de confirmar a transferência das proteínas, seguido do bloqueio da membrana com tampão TBST com BSA por 40min em agitação, em temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com anticorpo de camundongo primário anti-humano específico para a catalase (#LFM-MA0010, Invitrogen) e o anticorpo de coelho primário Pan-TEAD (D3F7L) como controle. Ambos diluídos (#13295S, CellSignaling Technology®) 1:2000 em TBST-BSA 5% por, pelo

menos, 16h em câmara fria. Após esse período, a membrana foi lavada 3x com TBST 1x com posterior incubação com os anticorpos secundários de cabra anti-camundongo e anti-coelho, marcados com HRP (*Horseradish Peroxidase*) (#A16066, Invitrogen e #7074s, CellSignaling Technology®) diluídos 1:2000 em TBST-BSA 5%.

Por fim, o kit *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, USA) foi usado para a detecção das proteínas de acordo com instruções do fabricante, e a revelação foi feita em fotodocumentador (Amersham™ Imager 600, GE) no departamento de Fisiologia da UFPR.

4.9 Análise estatística

A análise de expressão diferencial de miRNAs a partir dos dados do TCGA, após normalização, foi realizada através do teste t de *Student* na plataforma R no pacote Limma levando-se em consideração o valor de $p < 0,05$, $FDR < 0,05$ e FC de ± 2 . Para as análises de qPCR, a diferença de expressão foi calculada pelo método de $RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak e Schmittgen, 2001) no Quant Studio Real-Time PCR Software v1.3 (Applied Biosystems, USA). Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk para verificar a homogeneidade da variância. Os valores fora da curva (*outliers*) foram removidos. Testes não paramétricos foram realizados naqueles dados que não passaram nos testes. As comparações entre dois grupos foram calculadas pelo teste de Mann-Whitney e aqueles entre três ou mais grupos pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. O valor ajustado de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

As curvas ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) foram calculadas baseadas nos valores de RQ. Para as curvas ROC combinadas, uma regressão binária logística foi calculada, sendo seu resultado utilizado para então o cálculo da curva ROC propriamente dita. Os valores de corte, sensibilidade e especificidade foram determinados pelo cálculo do índice de Youden ((sensibilidade + especificidade) – 100). Os maiores valores indicam a melhor combinação, no entanto o valor clínico também foi levado em consideração (maiores valores para ambos os parâmetros foram considerados melhores que maior % de sensibilidade e baixa % de especificidade).

Os experimentos de ensaio funcional em cultivo celular foram conduzidos em triplicatas em três momentos independentes. Para o ensaio de viabilidade celular a concentração inibitória (CI-50) foi calculada pelo teste ANOVA de duas vias. Os ensaios de capacidade clonogênica, apoptose e migração foram analisados pelo teste t de *Student*, não pareado para os dois primeiros e múltiplo para o último. As análises funcionais levaram em consideração como valor de significância $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 9[®] (GraphPad Software Inc, USA), exceto pela regressão logística que foi calculada no IBM SPSS *Statistics Subscription* (IBM SPSS Statistics Inc, Armonk, NY, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de miRNAs candidatos

A análise a partir de dados do TCGA foi realizada a partir de duas matrizes de dados: “*Phenotypes*” com informações clínicas de 1.247 pacientes e “*IlluminaHiseq*” com dados de sequenciamento de 2.238 miRNAs maduros para 832 pacientes. O tratamento inicial da matriz de dados de sequenciamento resultou em uma primeira lista de 698 miRNAs para 824 pacientes.

Em seguida, usando as informações clínicas, as pacientes foram divididas de acordo com a classificação molecular (luminal A - LA, luminal B - LB, HER2+, e basal-like) e imunoistoquímica (receptores hormonais positivo (RH+, englobando LA e LB), HER2+ e triplo negativo) para a análise da expressão diferencial (TABELA 3). Dentre as diversas comparações, 19 miRNAs mostraram-se diferencialmente expressos com valor de *fold change* (FC) ≥ 2 , e comuns para as comparações entre o subtipo TN e os demais (NTN, RH+ e HER2+) (FIGURA 7) (TABELA 4). A partir destes foram selecionados os miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p para a análise em plasma, uma vez que estes convergem com os resultados de trabalhos anteriores do nosso grupo, conforme já descrito em Material e Métodos.

TABELA 3 - ANÁLISE DE *miRNAs* DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA A PARTIR DE DADOS DO TCGA.

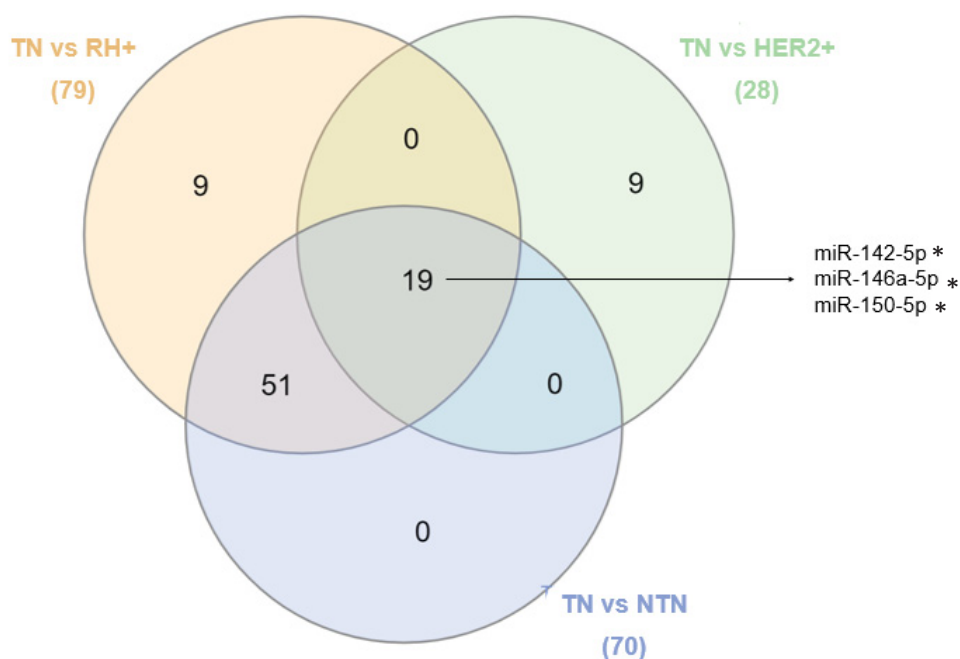
Comparação	Amostra (N)		miRNAs (N)		
	TA	TB	Expressão aumentada ^a	Expressão diminuída ^b	Total ^c
<i>Subtipo molecular</i>					
LA x LB	248	109	4	11	421
LA x BL	248	83	11	111	530
LA x HER2+	248	43	5	30	371
LB x BL	109	83	12	48	337
LB x HER2+	109	43	6	8	117
BL x HER2+	83	43	39	9	287
<i>Subtipo imunoistoquímico</i>					
TN x NTN	67	254	70	8	436

TN x RH+	67	233	79	8	450
TN x HER2+	67	21	28	7	103
HER2+ x RH+	21	233	24	7	186
RH+ x RH-	433	143	9	58	495

NOTA: ^a Número de miRNAs que apresentaram valor de *fold change* $\geq +2$, ou seja, foram considerados como mais expressos em um grupo em relação ao outro; ^b Número de miRNAs que apresentaram valor de *fold change* < -2 , ou seja, foram considerados como menos expressos em um grupo em relação ao outro; ^c Número total de miRNAs listados como diferencialmente expressos entre os grupos analisados englobando aqueles que apresentaram valores entre -2 e +2.

LEGENDA: TA: tumor do subtipo A; TB: tumor do subtipo B; N: tamanho da amostra; LA: luminal A; LB: luminal B; BL: basal-like; TN: triplo negativo; NTN: não triplo negativo; HR: hormonal receptor.

FIGURA 7 – NÚMERO DE miRNAs COM FOLD CHANGE ≥ 2 ENTRE TRIPLO NEGATIVO E DEMAIS GRUPOS



Legenda: TN: triplo negativo; RH+: receptor hormonal positivo (engloba os luminais A e B); * miRNAs selecionados entre os 19 listados como comuns a todos os grupos.

FONTE: A autora, 2021 (<http://www.interactivenn.net/>)

TABELA 4 - miRNAs COM FOLD CHANGE ≥ 2 COMUNS ENTRE TN E
DEMAIS GRUPOS

ID*	miRNA	FC		
		TN x NTN	TN x RH+	TN x HER2+
MIMAT0006789	hsa-miR-1468-5p	2,2	2,1	2,5
MIMAT0002808	hsa-miR-511-5p	2,2	2,2	2,1
MIMAT0000280	hsa-miR-223-3p	2,2	2,2	2,5
MIMAT0000451	hsa-miR-150-5p	2,3	2,3	2,3
MIMAT0000074	hsa-miR-19b-3p	2,3	2,3	2,0
MIMAT0000433	hsa-miR-142-5p	2,4	2,4	2,0
MIMAT0000092	hsa-miR-92a-3p	2,5	2,5	2,1
MIMAT0003150	hsa-miR-455-5p	2,5	2,5	2,3
MIMAT0004493	hsa-miR-20a-3p	2,7	2,7	2,3
MIMAT0000075	hsa-miR-20a-5p	2,9	3,0	2,3
MIMAT0000449	hsa-miR-146a-5p	2,9	2,9	2,6
MIMAT0000071	hsa-miR-17-3p	2,9	3,0	2,3
MIMAT0002891	hsa-miR-18a-3p	3,3	3,4	2,1
MIMAT0004784	hsa-miR-455-3p	3,4	3,5	2,6
MIMAT0000070	hsa-miR-17-5p	3,8	3,9	2,4
MIMAT0000072	hsa-miR-18a-5p	4,6	4,8	2,4
MIMAT0004977	hsa-miR-934	7,9	8,2	5,3
MIMAT0000758	hsa-miR-135b-5p	10,3	10,9	5,5
MIMAT0003242	hsa-miR-577	14,5	14,9	10,9

LEGENDA: ID: número de identificação do miRNA maduro; FC: *fold change*; TN: triplo negativo; NTN: não triplo negativo; HR+: receptores hormonais positivos (inclui os subtipos imunoistoquímicos luminal A e B).

Esses miRNAs atuam em diversas vias e condições biológicas relacionadas com a progressão, proliferação e apoptose do câncer (Chen et al., 2018; Iacona et al., 2019; Ke et al., 2021; Zhou et al., 2021).

A análise de vias KEGG para os miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p mostra que estão fortemente relacionados a importantes vias encontradas alteradas no câncer como do ERBB, TGF- β e Hippo, além de diferentes tipos de câncer (TABELA 5). A análise de *Gene Ontology* (GO) também relaciona esses miRNAs com

processos e funções essenciais como regulação da atividade de enzimas, ligação de proteínas do citoesqueleto, metabolismo de mRNA e resposta ao estresse (TABELA 6). Ambas as análises demonstram que os miRNAs tem como alvos diversos genes que participam dessas atividades celulares. Portanto uma desregulação nos níveis dessas moléculas pode afetar consideravelmente vias e processos contribuindo com o desenvolvimento tumoral. É importante ressaltar que não se pode excluir a existência de mais vias, processos e/ou alvos que não estejam cobertos pelas ferramentas utilizadas para essas análises.

TABELA 5 - TOP 20 VIAS KEGG COMUNS PARA OS miR-142-5p, miR-146-5p E miR-150-5p

Via de sinalização KEGG	Valor de p	# genes	# miRNAs
Doença de Prion	3,86E-09	5	2
Via de sinalização de plenipotência em células tronco	5,08E+06	31	3
Via de sinalização hormonal da tireoide	0.00019	24	3
Glioma	0.00020	16	3
Proteoglicanos em câncer	0.00021	33	3
Câncer colorretal	0.00066	16	3
Proteólise mediada por ubiquitina	0.00070	31	3
Via de sinalização ErbB	0.00394	22	3
Via de sinalização de esfingolipídios	0.00399	23	3
Via de sinalização de neutrófilo	0.00399	26	3
Câncer endometrial	0.00399	14	3
Câncer de pulmão de células não pequenas	0.00635	13	3
Melanoma	0.00714	16	3
Câncer de tireoide	0.00956	7	3
Metabolismo central de carbono no câncer	0.01165	16	3
Síntese de hormonal da tireoide	0.02128	8	3
Reabsorção de sódio mediado por aldosterona	0.02791	11	2
Leucemia mieloide crônica	0.02791	16	3
Via de sinalização TGF- β	0.03486	16	3
Via de sinalização Hippo	0.04390	27	3

LEGENDA: As vias foram listadas de acordo com os genes alvos (#genes) para os miRNAs (#miRNAs) analisados.

TABELA 6 - ANÁLISE DE GENE ONTOLOGY (GO) PARA OS miR-142-5p, miR-146-5p E miR-150-5p

Gene Ontology	Valor de p	#genes	#miRNA
Função molecular			
Ligação de íon	9,73E-39	682	3
Função molecular	2,60E-06	1585	3
Ligação de enzima	2,21E+03	144	3
Ligação de proteína do citoesqueleto	4,12E+06	87	3
Atividade de fator de transcrição de ligação ao ácido nucléico	4,68E+05	103	3
Atividade de fator de transcrição de ligação a proteína	0.0003794	54	3
Ligação ao domínio HECT	0.0066076	3	1
Atividade reguladora de enzima	0.0296744	80	3
Atividade de fosfatidilinositol-3-quinase	0.0473518	4	1
Processo biológico			
Processo metabólico do composto de nitrogênio	3,82E-22	509	3
Processo de modificação de proteína celular	1,25E-15	291	3
Processo biossintético	3,08E-09	416	3
Expressão gênica	5,13E-04	81	3
Via de sinalização do receptor de neurotrofilo TRK	6,93E-02	44	3
Via de sinalização do receptor Fc-epsilon	4,15E+00	31	3
Via de sinalização do receptor de fator de crescimento	2,85E+02	37	3
Sinalização mediada por fosfatidilinositol	9,01E+03	29	3
Via de sinalização do receptor de fator de crescimento de fibroblasto	2,34E+05	33	3
Processo metabólico de pequenas moléculas	3,09E+05	216	3
Processo biológico	1,63E+06	1504	3
Coagulação sanguínea	5,27E+06	51	3
Simbiose (englobando mutualismo por meio de parasitismo)	0.0001104	54	3
Processo catabólico	0.0001104	179	3

Processo viral	0.0001688	48	3
Via de sinalização contendo domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo	0.0001715	8	3
Resposta ao estresse	0.0002109	211	3
Montagem de componente celular	0.0005826	124	3
Processo metabólico de mRNA	0.0010672	26	3
Processo metabólico de lipídeo celular	0.0011834	20	3

LEGENDA: As funções e processos relacionados a análise de GO foram listadas de acordo com os genes alvos (#genes) para os miRNAs (#miRNAs) analisados.

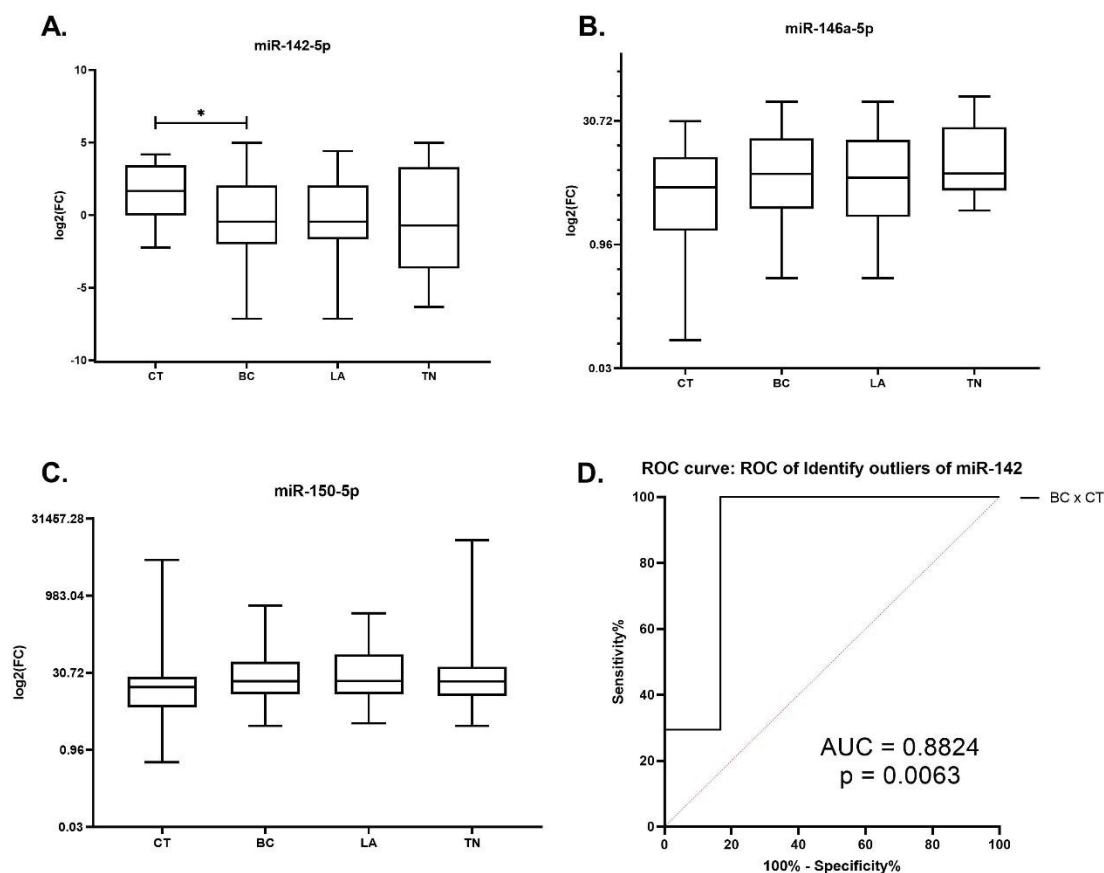
5.2 Avaliação da quantificação de miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p em plasma de pacientes com câncer de mama primário por RT-qPCR

A avaliação da quantificação dos miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p foi realizada em amostras de plasma de pacientes LA (N = 28), TN (N = 15) e controles (N = 19), além do grupo geral da doença câncer de mama que compreende a união de LA e TN (FIGURA 8 - A, B, C). Para os miR-146a-5p e miR-150-5p não foram encontradas diferenças de expressão significativa entre CM e CT, assim como entre os subtipos (FIGURA 8 – B, C). Apesar do miR-150-5p mostrar interessantes resultados na literatura com relação a tumorigênese mamária, uma vez que não encontramos significância em sua quantificação no plasma nem em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos, optamos por não seguir com sua análise. O miR-142-5p apresentou diferença de expressão significativa, mostrando-se menos expresso nas pacientes quando comparadas com o controle ($p = 0,0349$) (FIGURA 8 - A). Diante disso, o potencial diagnóstico do miR-142-5p livre em plasma foi testado através da análise de curvas de ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*). Quanto mais próximo de 1 é o valor obtido, melhor é a acurácia do teste. O miR-142 apresentou uma área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) de 0,8824, com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 83,33% para o valor de corte ideal de 0,83 (FIGURA 8 - D).

O miR-142-5p já foi relacionado com a modulação da proliferação, apoptose, invasão, migração em linhagens de CM e, também, com metástase em linfonodo em pacientes (Xu e Wang, 2018; Yu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021). A redução da expressão

de miR-142-5p em vesículas extracelulares de soro de pacientes com CM foi associado ao grau III e maior tamanho tumoral (Ozawa *et al.*, 2020). No nosso trabalho, devido ao tamanho amostral pequeno, não foi possível realizar as análises de relação com os parâmetros clínicos e histopatológicos com a expressão dos miRNAs. Além disso, no mesmo estudo de Ozawa *et al.* (2020) foi proposto um painel com o miR-142-5p juntamente com o miR-320a e miR-4433b capaz de distinguir pacientes de CM de controles. Diante disso, uma maior exploração do papel do miR-142-5p tanto no nível funcional como na forma de biomarcador mostram-se promissoras e seria importante quantificá-lo em um maior grupo amostral.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIFICAÇÃO DO miRNA-142-5p, miRNA-146a-5p E miRNA-150-5p POR RT-qPCR EM PLASMA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CONTROLES



A análise da quantificação por RT-qPCR em plasma de pacientes com câncer de mama e controles para miR-142-5p (A), miR-146a-5p (B) e miR-150-5p (C). (D) Análise de curva de ROC para o miR-142-5p.

LEGENDA: CT = controle; BC = pacientes; LA = subtipo luminal A; TN = subtipo triplo-negativo; AUC = area under the curve

Não encontramos concordância entre os dados obtidos nas análises do TCGA e em plasma para os três miRNAs avaliados já que a primeira indicou um aumento da expressão desses miRNAs em pacientes TN com relação aos demais subtipos.

No entanto, apesar de não significativa, observa-se uma tendência para o miR-142-5p e miR-146a-5p apresentarem maior expressão no subtipo TN em relação ao LA em plasma. Como mencionado anteriormente, os dados do TCGA provêm de amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente que foram aqui usados para realizar um direcionamento da escolha de miRNAs a serem avaliados de forma livre em amostras de plasma. É importante ressaltar que quando falamos em biópsia líquida estamos nos referindo a um conjunto de moléculas que circulam pelos fluídos corporais e que podem apresentar diversas origens não necessariamente provenientes do tumor. Diante disso, os resultados obtidos de alterações de níveis de cf-RNAs podem ser observados devido a um desequilíbrio da homeostase do organismo que, no campo da oncologia, estudos relacionam com a possível presença de tumor ou ainda atuam como um sinal de atenção para determinadas características clínico-patológicas. Isso permite que a equipe médica possa realizar uma investigação mais cuidadosa da situação do paciente, muitas vezes antes mesmo desse apresentar sintomas ou alterações visíveis em exames padrões. Portanto, a discordância observada nesse estudo entre os níveis dos miRNAs avaliados em tecido e plasma pode ser referente a esse cenário, assim como o reduzido número de amostras utilizadas e o desvio padrão relativamente elevado.

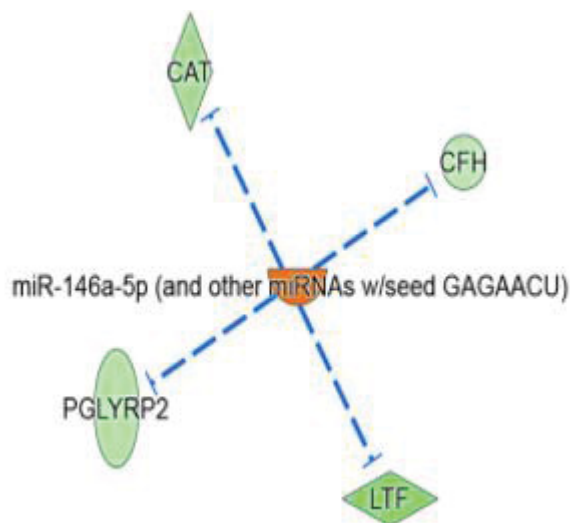
5.3 Análise *in vitro* do miR-146a-5p

O miR-146a-5p tem como alvos importantes mRNAs codificadores de proteínas que participam de vias celulares encontradas desreguladas no câncer como, por exemplo, NF- κ B, BRCA1 e BRMS1 que atuam na promoção da inflamação, proliferação e metástase respectivamente (APÊNDICE 2).

A diversidade de interações possíveis entre miRNAs e mRNAs cria um campo a ser sempre explorado. Dentro desse cenário, Gomig *et al* (2019) ao avaliarem proteínas diferencialmente expressas entre tecidos tumoral e não-tumoral mamários sugeriram, com base em predições do programa *IngenuityR Pathway Analysis* v. 2.3 (IPA), as proteínas CAT (catalase), LFH (lactotransferrina), CFH (fator complementar

H) e PGLYRP2 (proteína de reconhecimento de peptidoglicano) como alvos do miR-146a-5p (FIGURA 9). As quatro proteínas foram encontradas menos expressas nos tecidos malignos nas análises proteômicas, enquanto o miR-146a-5p foi predito como aumentado sugerindo uma possível relação de regulação.

FIGURA 9 - REGULADORES UPSTREAM PARA PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM AMOSTRAS DE TUMOR DE MAMA



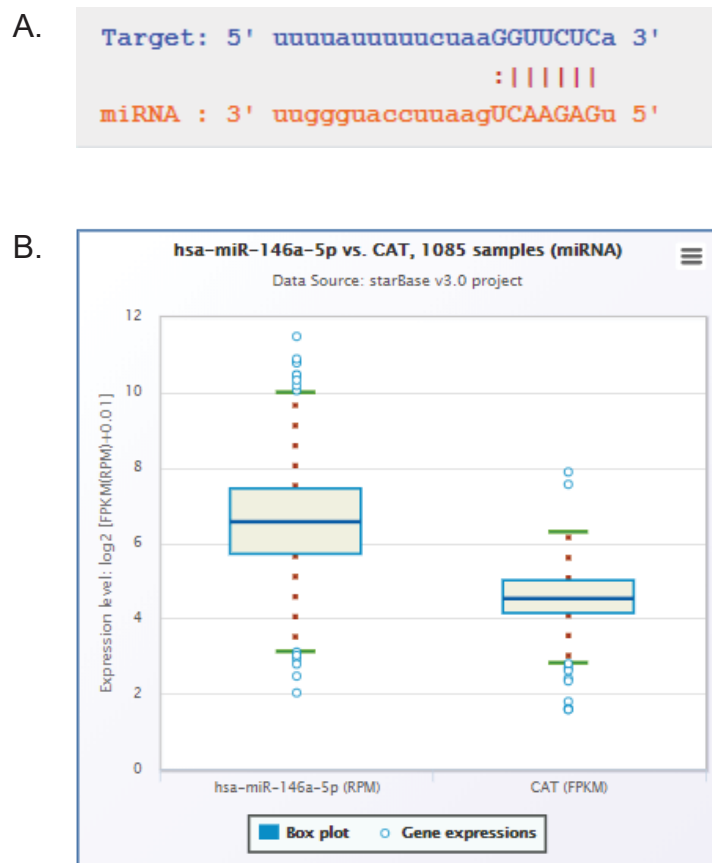
LEGENDA: CAT – catalase; LFH – lactotransferrina; CFH - fator complementar H; PGLYRP2 - proteína de reconhecimento de peptidoglicano.
FONTE: Reproduzido, com permissão, do artigo “Quantitative label-free mass spectrometry using contralateral and adjacent breast tissues reveal differentially expressed proteins and their predicted impacts on pathways and cellular functions in breast cancer” (Gomig *et al.*, 2019)

Na literatura há poucos relatos da relação de interação do miR-146a-5p e CAT sendo a maioria em outras doenças, por exemplo diabetes do tipo 2 (Roshanravan *et al.*, 2020) e doença de Alzheimer (Lei *et al.*, 2021), porém com foco na avaliação dos níveis de catalase no contexto antioxidante. Cheleschi *et al.* (2019) avaliaram miRNAs em fibroblastos sinoviais de osteoartrite e observaram que a inibição do miR-146a-5p na linhagem promoveu a redução do mRNA da CAT sugerindo uma relação entre essas moléculas. No contexto do câncer, essa relação foi relatada em linhagens de câncer de pulmão onde o silenciamento de RIP1 (proteína de interação ao receptor 1) levou à redução da CAT mediada por miR-146a, indução de espécies reativas de oxigênio (EROS), degradação de IAP (proteína de inibição da apoptose) e aumento

da citotoxicidade das células à cisplatina (Wang et al., 2014). Com relação ao câncer de mama, até onde sabemos, não há relatos da interação, direta ou indireta, entre miR-146a-5p e CAT.

Na predição de alvos para o miR-146a-5p, a CAT surgiu como um provável alvo em quatro plataformas de análise (miRWalk, miRcode, Starbase e miRanda). É possível observar a existência de uma complementariedade do miR-146a-5p com a região 3'UTR do mRNA da CAT envolvendo a região *seed* de interação do miRNA (FIGURA 10 - A). Além disso, ao realizar a análise da expressão do miRNA e do alvo, na plataforma *Starbase*, é possível observar uma relação inversamente proporcional entre essas moléculas indicando uma possível via de regulação (FIGURA 10 - B).

FIGURA 10 - RELAÇÃO DO miR-146a-5p E CATALASE POR ANÁLISE *IN SÍLICO*



A. Interação direta entre a CAT e o miR-146a-5p. Em azul está representada a sequência nucleotídica do mRNA da CAT e em vermelho do miR-146a-5p. Os traços verticais entre as sequências representam a região predita de interação entre as moléculas. **B.** Gráfico representando os níveis de expressão em log2 do miR-146a-5p e da CAT.

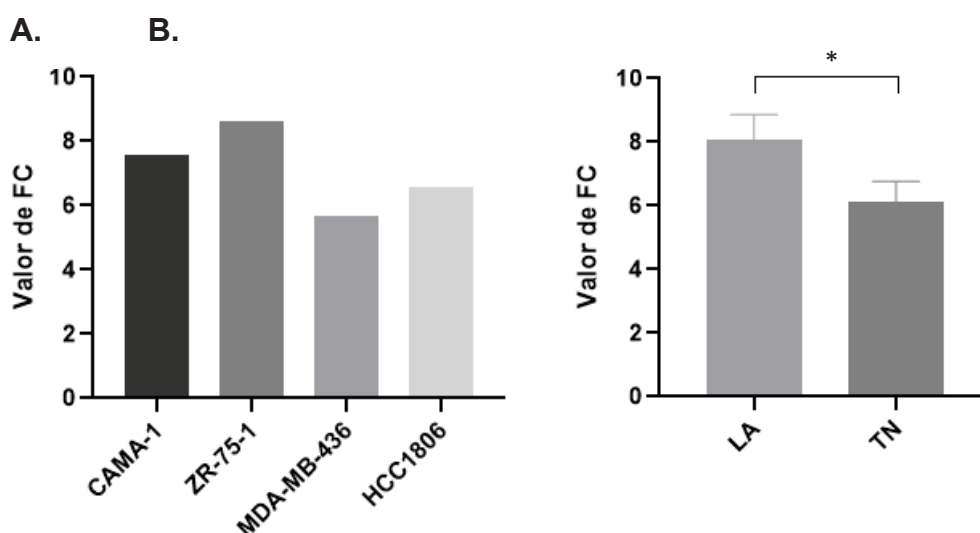
FONTE: Starbase (2021)

Diante disso, procuramos investigar o efeito do aumento da expressão do miR-146a-5p no comportamento da linhagem MCF-7 de câncer de mama e nos níveis de CAT.

Analizamos a expressão do miR-146a-5p em 10 linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, CAMA, ZR-75-1, T47D, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436 e HCC1806) e duas linhagens consideradas não tumorais de mama (MCF-10A, 184B5). Os resultados refletiram os obtidos a partir do TCGA com as linhagens TN apresentando maior expressão do miR-146a-5p com relação às LA (FIGURA 11). Portanto, uma linhagem do subtipo luminal A, MCF-7, que apresenta menor expressão do miR em relação ao TN foi escolhida para a investigação do aumento de expressão do miR-146a-5p no comportamento tumoral e com seu alvo potencial.

Esses resultados reforçam a ideia de que esse miRNA pode ser um interessante biomarcador de prognóstico na diferenciação dos subtipos de câncer de mama.

FIGURA 11 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO miR-146a-5p EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA



A. Avaliação da expressão do miR-146a-5p em quatro linhagens de câncer de mama em relação à linhagem considerada normal de mama, MCF-10A. Aqui estão representadas apenas quatro linhagens das 10 avaliadas, uma vez que as demais apresentaram valores de *fold change* (FC) menores do que 1. B. Avaliação da expressão do miR-146a-5p entre as linhagens do subtipo LA e TN. * p<0.05
LEGENDA: FC – *Fold Change*; LA – Luminal A, TN – Triplo Negativo.

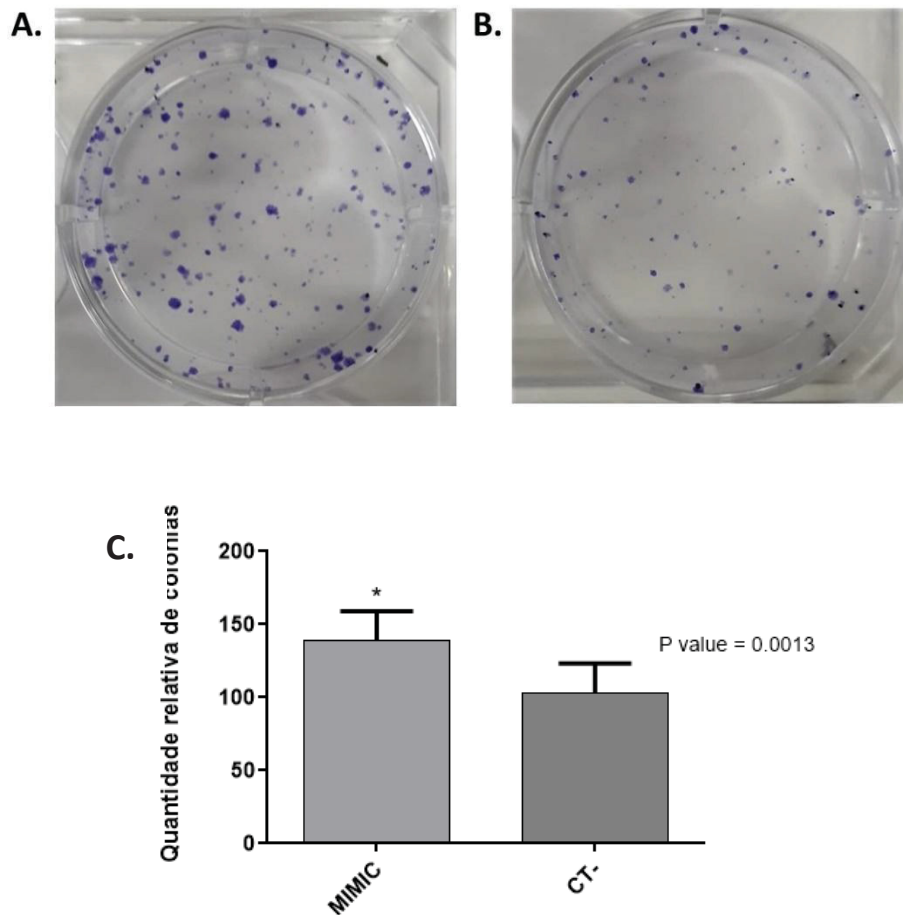
5.3.1 Aumento da expressão de miR-146a-5p aumenta a capacidade clonogênica e a expressão de CAT enquanto reduz a apoptose em MCF-7

O aumento da expressão de miR-146a-5p na linhagem MCF-7 devido a transfecção de molécula mimetizadora que aumentou, em média, 390.000 vezes a expressão do miR (MCF-7-146a = células MCF-7 transfectadas com o *mimic* do miR-146a-5p) quando comparada ao controle (MCF-7-CT = células MCF-7 transfectadas com o controle). A partir disso, foram realizados os ensaios funcionais de capacidade clonogênica, viabilidade, migração e apoptose.

O ensaio clonogênico demonstrou uma diferença significativa com relação à formação de colônias indicando que as células MCF-7-146a tiveram maior capacidade de crescimento dando origens a colônias ($p = 0,0013$) (FIGURA 12). A formação de clones dentro do contexto do câncer é interpretada como uma característica de células que apresentam capacidade de iniciação tumoral. O miR-146a-5p, como também demonstrado aqui, é relatado mais expresso no subtipo molecular *basal-like* e no imunoistoquímico triplo-negativo considerados agressivos e com maior incidência entre mulheres mais jovens (Li *et al.*, 2015). Diante disso, ao observar que o aumento desse miR em uma linhagem LA promoveu a formação de colônias pode ser um indicativo de sua atuação sobre vias responsáveis pela iniciação tumoral já que tem como alvos diversos genes supressores tumorais como *BRCA1* e *EGFR*.

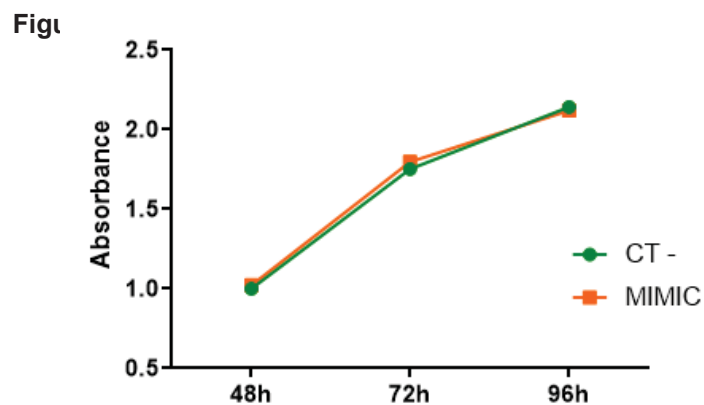
No entanto, apesar da possível influência dos níveis de miR-146a-5p na formação tumoral, o ensaio de viabilidade celular não indicou ação sobre a manutenção e estabilidade das células (FIGURA 13).

FIGURA 12 - ENSAIO CLONOGÊNICO EM MCF-7



A. Ensaio clonogênico com MCF-7 transfectada com miR-146a-5p; B. Ensaio clonogênico com MCF-7 transfectada com o controle; C. Gráfico representativo da diferença significativa entre os tratamentos no ensaio clonogênico. Valor de p significativo = 0,01 (*).

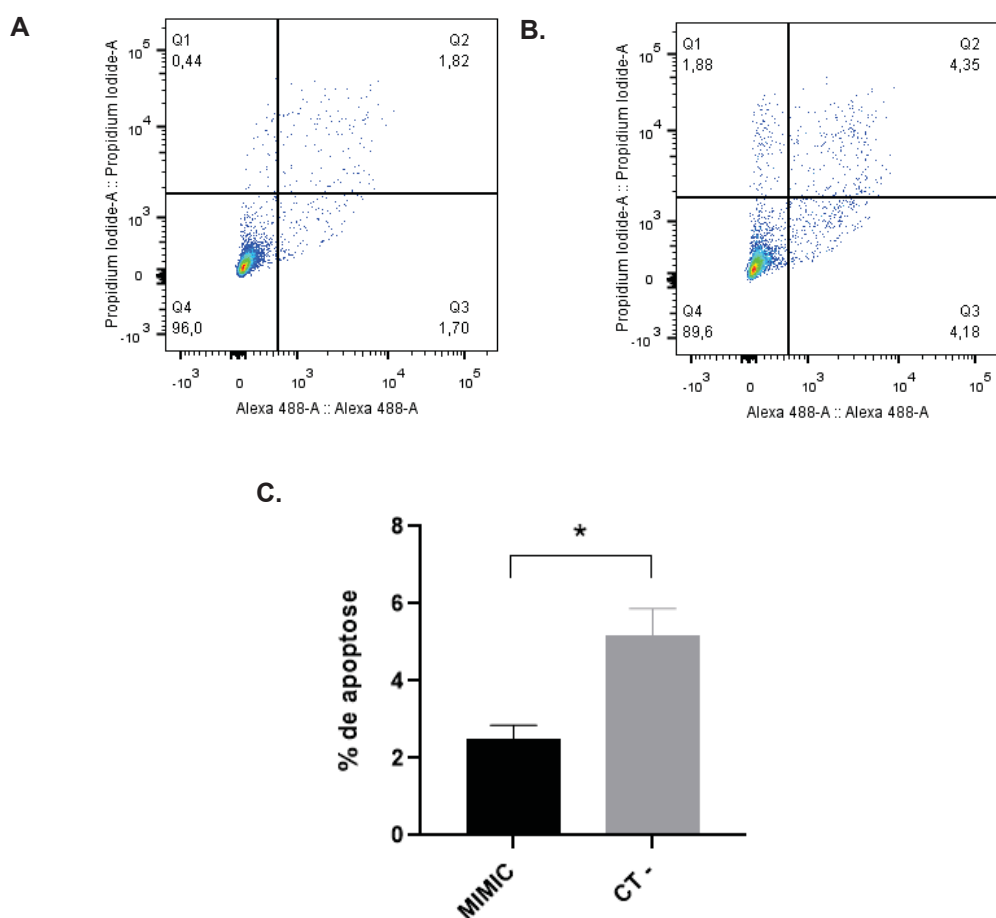
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR



Viabilidade celular entre células MCF-7 transfectadas com miR-146a-5p (MIMIC) e controle negativo (CT-) por meio da absorbância ao longo do tempo.

A análise de apoptose demonstrou que o aumento de expressão de miR-146a-5p foi capaz de reduzir a morte por apoptose sugerindo ação desse miR na via de morte celular ($p < 0,0001$) (FIGURA 14). Um dos principais alvos do miR-146a-5p é o NF- κ B que tem papel importante na via de apoptose uma vez que promove a transcrição de moléculas pro-apoptóticas. Assim, o aumento de expressão de miR-146a-5p levaria à redução de NF- κ B e, portanto, à inibição da apoptose.

FIGURA 14 - ENSAIO DE APOPTOSE CELULAR EM MCF-7

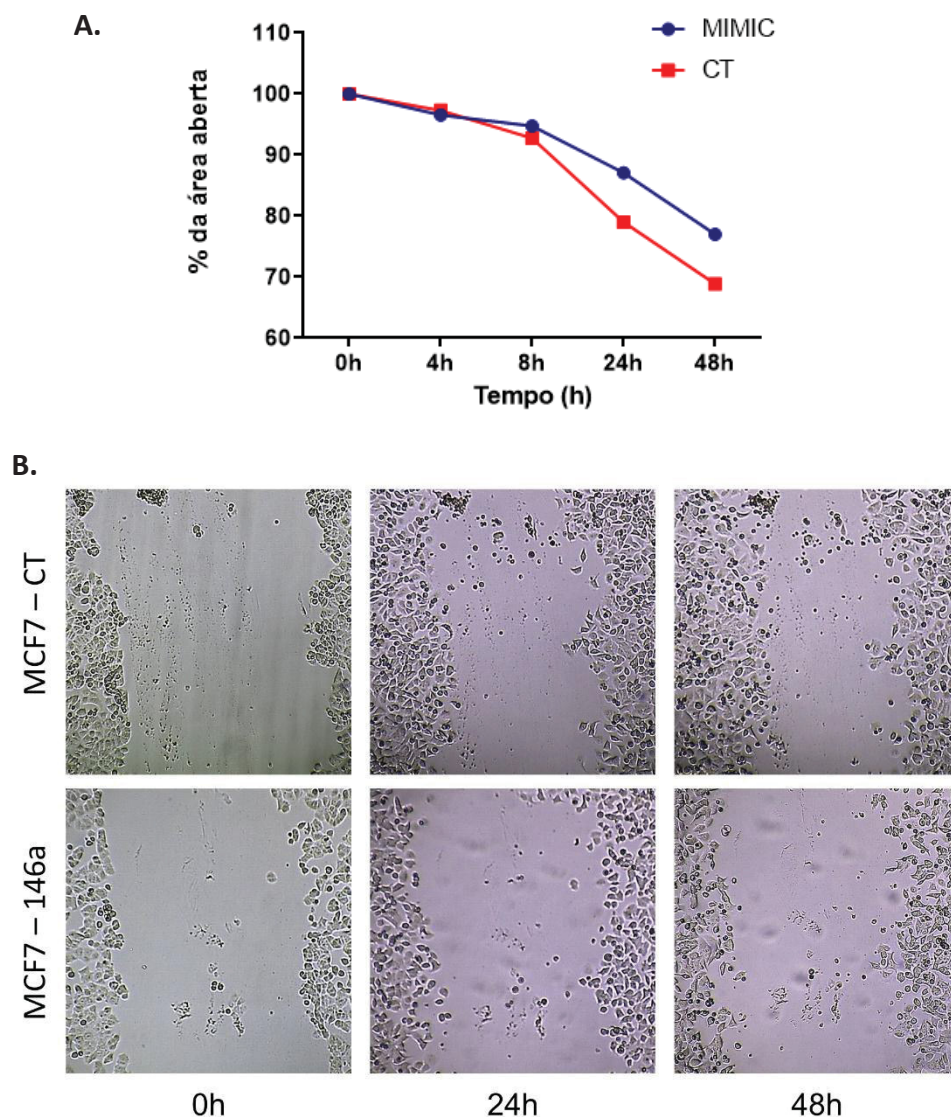


Ensaio de apoptose celular em MCF-7 transfectada com o *mimic* do miR-146a-5p (A) e controle (B). O gráfico se dá pela medição de fluorescência do iodeto de propídio pela Anexina e representa quatro quadrantes sendo Q1 - população de células em processo de necrose, Q2 - população de células em processo de necrose inicial e apoptose tardia, Q3 - população de células em processo de apoptose e Q4 - população de células vivas. C - Representação gráfica da média das porcentagens obtidas por citometria de fluxo para as células transfectadas com o *mimic* e o controle negativo. * valor de $p < 0,0001$

Em relação ao processo de migração, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p = 0.058$), apesar de observarmos

uma tendência com relação a redução da migração a partir do aumento de expressão do miR-146a-5p (FIGURA 15). O miR-146a-5p é considerado um metastamiR mediante relatos de sua influência sobre os processos de migração e invasão (Bhaumik, 2008).

FIGURA 15 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR EM MCF-7



A – Análise do ensaio de migração sendo a porcentagem (%) de área aberta avaliada ao longo do tempo ($p > 0,05$). B – Imagens do ensaio de *scratch* para a linhagem MCF-7 transfectada com o mimic do miR-146a-5p (MCF-7 – 146a) e controle (MCF-7 – CT) nos tempos de 0h, 24h e 48h.

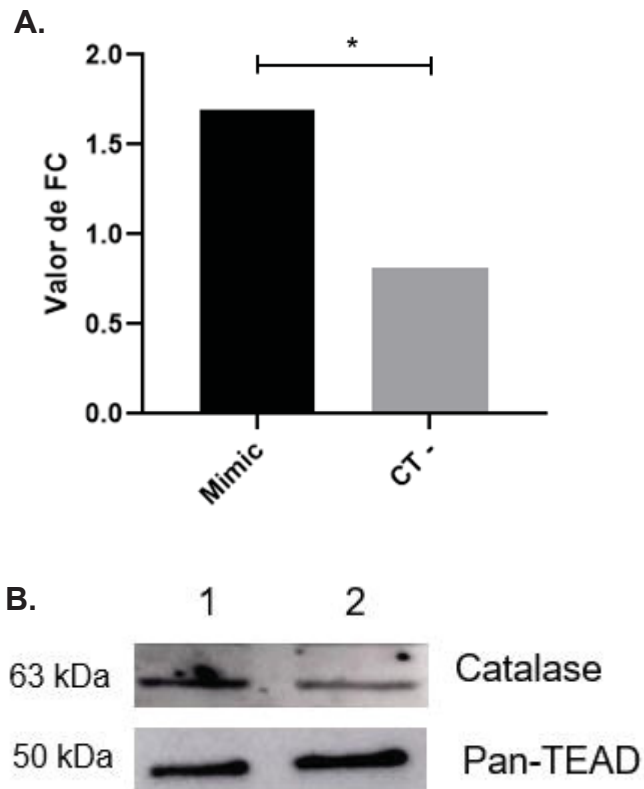
A catalase é uma importante enzima antioxidante tendo como principal função a transformação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água ($2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} +$

O₂) protegendo a células de danos oxidativos. No entanto, a CAT também participa de outros processos como a modulação do crescimento celular principalmente por meio de sua capacidade de detoxificação, tem atividade oxidase além de realizar desintoxicação ou ativação de compostos tóxicos e antitumorais (Nishikawa *et al.*, 2009; Glorieux *et al.*, 2018).

Normalmente as células tumorais produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) uma vez que geralmente exibem mutações mitocondriais e redução da expressão de enzimas antioxidantes como a CAT. As EROs desempenham importante papel nas células tumorais por promover alterações no DNA e contribuir com a instabilidade genômica. Em contrapartida, altos níveis de EROs acabam induzindo mecanismos de morte celular (Glorieux *et al.*, 2015).

A regulação da CAT no nível de RNA se dá pela sua interação com miRNAs, por exemplo o miR-450 e miR-30b (Haque *et al.*, 2012). Como relatado anteriormente, o miR-146a-5p foi predito como provável regulador do mRNA dessa proteína. Por isso, após a realização da transfecção da linhagem MCF-7 realizamos a extração proteica e avaliamos a expressão da CAT. O ensaio de WB mostrou que quando o miR-146a-5p está mais expresso ocorre um aumento significativo da CAT em comparação ao controle (FIGURA 16). Diante do exposto, esse resultado indicaria uma redução de EROs uma vez que mais CAT estaria sendo produzida. No entanto, essa molécula não foi avaliada no presente estudo. Assim, se faz necessário uma abordagem mais ampla para avaliar de que maneira o miR-146a-5p estaria regulando a CAT em células tumorais mamárias.

FIGURA 16 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO
PROTEICA DA CATALASE NA LINHAGEM
MCF-7 DO miR-146a-5p



A. representação gráfica da média do *fold change* (FC) entre os extratos proteicos provenientes de células MCF-7 tratadas com o *mimic* do miR-146a-5p e o controle negativo (CT-). B. Análise de *Western blotting* demonstrando a expressão proteica da Catalase e do controle Pan-TEAD em células MCF-7 tratadas com o *mimic* do miR-146a-5p (1) e o controle negativo (2).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os miRNAs são interessantes potenciais biomarcadores no campo da oncologia assim como o uso da biópsia líquida. Esse trabalho procurou avaliar os miRNAs miR-142-5p, miR-146a-5p e miR-150-5p no plasma de pacientes com câncer de mama e investigar o papel funcional do miR-146a-5p na linhagem MCF7 de câncer de mama.

O miR-142-5p mostrou-se um interessante potencial biomarcador para diagnóstico do CM uma vez que o observamos diferencialmente expresso entre pacientes e controles. Diante disso, uma investigação mais ampla, principalmente em conjunto com outros miRs, colabora para o estabelecimento de futuros painéis que possam auxiliar no diagnóstico do CM. Assim, pretendemos aumentar nossa amostra com o objetivo de realizar análises da expressão do miR-142-5p com importantes parâmetros clínicos histopatológicos como presença de metástase em linfonodo axilar, tamanho tumoral e grau histológico.

A modulação do miR-146a-5p, no presente estudo, se mostrou importante nas células MCF-7 uma vez que o aumento de sua expressão levou ao aumento da capacidade clonogênica e redução da apoptose, características importantes para a tumorigênese mamária. Esses dados demonstram a potencial relação entre essa molécula e o CM colaborando com a constante produção de informação e chamando atenção para seu possível uso como alvo dentro do manejo do CM futuramente. Além disso, a relação do miR-146a-5p com a catalase precisa ser mais explorada uma vez que nossos dados demonstraram que quando ocorre o aumento da expressão do miR, ocorre também um aumento dos níveis proteicos da CAT. Não há estudos avaliando esta interação diretamente. Deste modo, estamos realizando tal análise de interação pelo método do ensaio de luciferase. Essa abordagem tem como objetivo responder ao questionamento sobre a interação direta entre miR e mRNA.

Estudos adicionais, validando os resultados obtidos em um grupo maior de amostras de pacientes com câncer de mama esporádico e indivíduos controles devem ser realizados para determinar com segurança o potencial desses miRNAs. Por fim, este trabalho gerou resultados que abrem a possibilidade de investigação dos miRNAs aqui relatados, assim como a interação com alvos como a CAT, em outros tipos de amostras tumorais e de biópsias líquidas, como por exemplo em VEs, soro e urina.

7. REFERENCIAS

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, v. 71, n. 3, p. 209-249. 2021. Doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Estimativa 2020**. Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde**. 2019. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>

ASANTE, D. B. et al. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time? **Cancer Lett**, n. 468, p. 59-71. Doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.014.

CULLIANE, C. et al. Association of Circulating Tumor DNA With Disease-Free Survival in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Netw Open**, n. 3, v. 11, e2026921, 2020. Doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.26921

PUCHE-SANZ, I. et al. Liquid biopsy and prostate cancer. Current evidence applied to clinical practice. **Actas Urol Esp** (Eng II Ed), v. 44, n. 3, p. 139-147. Doi: 10.1016/j.acuro.2019.08.007.

HEIDRICH, I. et al. Liquid biopsies: Potential and challenges. **Int J Cancer**, n. 148, v. 3, p. 528-545, 2021. Doi: 10.1002/ijc.33217.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659–672, 2007

THULER, L. C. S.; MENDONÇA, G. A. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 11, p. 656–660, 2005. Doi: 10.1590/S0100-72032005001100004.

ALEXEEFF, E. S. et al. Reproductive Factors and Mammographic Density: Associations Among 24,840 Women and Comparison of Studies Using Digitized Film-Screen Mammography and Full-Field Digital Mammography. **Am J Epidemiol**, v. 188, n. 6, p. 1144-1154, 2019. Doi: 10.1093/aje/kwz033.

CHONG, F. et al. Sedentary behavior and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis from prospective studies. **Breast Cancer**, v. 28, n. 1, p. 48-59, 2021. Doi: 10.1007/s12282-020-01126-8.

BRITT, K.; CUZICK, J.; PHILLIPS, K. A. Key steps for effective breast cancer prevention. **Nat Rev Cancer**, v. 20, n. 8, p. 417-436, 2020. Doi: 10.1038/s41568-020-0266-x

KANADYS, W. et al. Use of Oral Contraceptives as a Potential Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies Up to 2010. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 9, p. 4638, 2021. Doi: 10.3390/ijerph18094638.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Estimativa 2014**. Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde**. 2014. Disponível em <https://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf>

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: **American Cancer Society**, 2019. Disponível em <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>>

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J of Clin Oncol**, v.27, n. 8, p. 1160–1167, 2009. Doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370

Amin, M. B. et al. American Joint Committee on Cancer: Cancer Staging Manual; 8th edition, 3rd printing, **Springer**, 2018. Disponível em <<https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/pages/default.aspx>>

KLEIHUES, P.; SOBIN, L. H. World Health Organization classification of tumors. **Cancer**. V. 88, n. 12, p. 2887, 2000. Doi: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12<2887::aid-cnrc32>3.0.co;2-f

TAVASSOLI, F. A; DEVILEE, P. Pathology and Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. International Agency for Research on Cancer/World Health Organization Classification of Tumours. Volume. 4. **IARC Press**; 2003. Disponível em <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Tumours-Of-The-Breast-And-Female-Genital-Organs-2003>>

WHO – World Health Organization. Classification of Tumors Editorial Board. WHO classification of tumors, 5th edition – Breast tumors. Lyon: **International Agency for Research on Cancer 2019**. Disponível em <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours>>

DIECI, M. V. et al. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. **Oncologist**, v. 19, n. 8, p. 805-813, 2014. Doi: 10.1634/theoncologist.2014-0108

SEER*Stat Databases: NAACCR Incidence Data - CiNA Analytic File, 1995-2016, for NHIv2 Origin and for Expanded Races, Custom File With County, ACS Facts and Figures projection Project (which includes data from CDC's National Program of Cancer Registries (NPCR), CCCR's Provincial and Territorial Registries, and the NCI's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Registries), certified by the North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR) as meeting high-quality incidence data standards for the specified time periods, 2018.

CSERNI, G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. **Pathologica**, v. 112, n. 1, p. 25-41, 2020. Doi: 10.32074/1591-951X-1-20

ELSTON, 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. Doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x

Pathology Reporting of Breast Disease: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for Pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. Sheffield; **NHS Cancer Screening Programmes and The Royal College of Pathologists**, 2005.

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n.4, p. 207, 2010. Doi: 10.1186/bcr2607

CARTER, C.L. et al. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, p. 181-187, 1989. Doi: 10.1002/1097-0142(19890101)63:1<181::aid-cnrc2820630129>3.0.co;2-h

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. Doi: 10.1038/35021093

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001. Doi: 10.1073/pnas.191367098

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 14, p. 8418–23, 2003. Doi: 10.1073/pnas.0932692100

BIRNBAUM, D. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? **Int J Oncol**, v. 25, n. 2, p. 249-58, 2004.

BASELGA, J. et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 3, p. 737-744, 1996. Doi: 10.1200/JCO.1996.14.3.737

VIEIRA, D. S. C. et al. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008. Doi: 10.1590/s0100-72032008000100008.

BADVE, S. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Mod Pathol**, v. 24, p. 157-167, 2011. DOI: 10.1038/modpathol.2010.200

BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D. Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype. **Curr Mol Med**, v. 12, p. 96-110, 2012. DOI: 10.2174/156652412798376134

GEENEN, J. J. J. et al. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. **Clin Pharmacokinet**, v. 57, n. 4, p. 427-437, 2018. Doi: 10.1007/s40262-017-0587-4

DIANA, A. et al. Early Triple Negative Breast Cancer: Conventional Treatment and Emerging Therapeutic Landscapes. **Cancers**, v.12, n. 4, p. 819, 2020. Doi:10.3390/cancers12040819

GONÇALVES, A. et al. PARP Inhibitors in the Treatment of Early Breast Cancer: The Step Beyond? **Cancers**, v. 12, n.6, p. 1378, 2020. Doi:10.3390/cancers12061378

SCHMID, P. et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet Oncol**, v. 21, n. 1, p.44-59, 2020. Doi: 10.1016/S1470-2045(19)30689-8.

FARMER, P. et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660–4671, 2005. DOI: 10.1038/sj.onc.1208561

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, R76, 2007. DOI: 10.1186/gb-2007-8-5-r76

SANGA, S. et al. Gene expression meta-analysis supports existence of 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. DOI: 10.1186/1755-8794-2-59

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010. DOI: 10.1186/bcr2635

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol**, v. 24, n. 9, p. 2206-23, 2013. Doi: 10.1093/annonc/mdt303

AZIM, H. A. et al. Personalized treatment in metastatic triple-negative breast cancer: The outlook in 2020. **Breast J**, v. 26, n. 1, p. 69-80, 2020. Doi: 10.1111/tbj.13713.

CAREY, L. A et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 8, p. 2329-2334, 2007. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1109

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**, v. 378, n. 9805, p. 1812-23, 2011. Doi: 10.1016/S0140-6736(11)61539-0

ALIZART, M. et al. Molecular classification of breast carcinoma. *Diagnostic Histopathology*, v. 18, n. 3, 2012.

PRAT, A. et al. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. **Oncologist**, v. 18, n. 2, p. 123–133, 2013. DOI: 10.1634/theoncologist.2012-0397

PARKER, J. S. et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1160-7, 2009. Doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370

CHEANG, M. C. U. et al. Quantitative hormone receptors, triple-negative breast cancer (TNBC), and molecular subtypes: A collaborative effort of the BIG-NCI NABCG.ProcAm **Soc Clin Oncol**, n. 15, p. 1008-1008, 2012. Doi: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.1008.

BASTIEN, R. R. L. et al. PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-qPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers. **BMC Med Genomics**, v. 5, n. 44, 2012. Doi: 10.1186/1755-8794-5-44

LEHMANN, B D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, v. 121, n. 7, p.2750-2767, 2011. Doi: 10.1172/jci45014.

MARRA, A.; VIALE, G.; CURIGLIANO, G. Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. **BMC Medicine**, v. 17, n. 90, 2019. Doi: 10.1186/s12916-019-1326-5

BURSTEIN. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 7, p. 1688-1698, 2015. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0432.

MASUDA, H. et al. Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 19, p. 5533-5540, 2013. Doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-0799.

SASLOW, D. et al. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. **CA Cancer J Clin**, v. 57, n. 2, p. 75-89, 2007. Doi: 10.3322/canjclin.57.2.75

OEFFINGER, K. C. et al. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. **JAMA**, v. 314, n. 15, p. 1599-1614, 2015. Doi: 10.1001/jama.2015.12783

MARMOT, M. G. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. **Br J Cancer**, v. 108, n. 11, p. 2205-2240, 2012. Doi: 10.1038/bjc.2013.177

COLDMAN, A. et al. Pan-Canadian study of mammography screening and mortality from breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 106, n. 11, dju261, 2014. Doi: 10.1093/jnci/dju261.

PACI, E. et al. European breast cancer service screening outcomes: a first balance sheet of the benefits and harms. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 7, p. 1159-1163, 2014. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0320.

TABAR, L. et al. The incidence of fatal breast cancer measures the increased effectiveness of therapy in women participating in mammography screening. **Cancer**, v.125, n. 4, p. 515-523, 2019. DOI: 10.1002/cncr.31840

LEHMANN, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **Plos One**, v. 16, n. 11, e0157368, 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0157368.

VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002. Doi: 10.1056/NEJMoa021967

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 27, p. 2817-26, 2004. Doi: 10.1056/NEJMoa041588

BUYSE, M. et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. Journal of the national cancer institute. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 17, p. 1183-92, 2006. Doi: 10.1093/jnci/djj329

EBCTCG - Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. **Lancet Oncol**, v. 19, n. 1, p. 27-39, 2018. Doi: 10.1016/S1470-2045(17)30777-5

VISVANATHAN, H. J. et al. Use of Endocrine Therapy for Breast Cancer Risk Reduction: ASCO Clinical Practice Guideline Update. **J Clin Oncol**, v. 37, n. 5, p. 423-438, 2019. Doi: 10.1200/JCO.18.01160.

BURSTEIN, H. J. et al. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. **J Clin Oncol**, v. 37, n. 5, p. 423-438, 2019. Doi: 10.1200/JCO.18.01160

SLACK, F. J.; CHINNAIYAN, A. M. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. **Cell**, v. 179, n. 5, p. 1033-1055, 2019. Doi: 10.1016/j.cell.2019.10.017

ZHANG, P. et al. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. **J Integr Bioinform**, v. 16, n. 3, p. 20190027, 2019. Doi: 10.1515/jib-2019-0027

WU, T. et al. Mir-30b-5p Promotes Proliferation, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells via Targeting ASPP2. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020. Doi: 10.1155/2020/7907269

ZHANG, P. et al. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. **J Integr Bioinform**, v. 16, n. 3, p. 20190027, 2019. Doi: 10.1515/jib-2019-0027

CITRON, F. et al. Downregulation of miR-223 expression is an early event during mammary transformation and confers resistance to CDK4/6 inhibitors in luminal breast cancer. **Cancer Res**, v. 80, n. 5, p. 1064-1077, 2020. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1793

NIEDŹWIECKI, S. et al. Serum levels of circulating miRNA-21, miRNA-10b and miRNA-200c in triple-negative breast cancer patients. **Ginekol Pol**, v. 89, n. 8, p. 415-420, 2018. Doi: 10.5603/GP.a2018.0071.

HETTA, H. F. et al. Circulating miRNA-21 and miRNA-23a Expression Signature as Potential Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer. **Microna**, v. 8, n. 3, p. 206-215, 2019. Doi: 10.2174/1573399815666190115151500.

ARROYO, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 108, n. 12, p. 5003–8, 2011. Doi: 10.1073/pnas.1019055108

VICKERS, K. C. et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 423-33, 2011. Doi: 10.1038/ncb2210.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**, v. 30, p. 255-289, 2014. Doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

OZAWA, P. M. M. et al. Identification of miRNAs Enriched in Extracellular Vesicles Derived from Serum Samples of Breast Cancer Patients. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 150, 2020. Doi:10.3390/biom10010150

ZHAO, H. et al. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS ONE*, v. 5, n. 10, e13735 2010. Doi: 10.1371/journal.pone.0013735.

CREE, I. A. et al. The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer: A systematic mapping review. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 697, 2017. Doi: 10.1186/s12885-017-3693-7

FOJ, L. et al. Exosomal and non-exosomal urinary miRNAs in prostate cancer detection and prognosis. **Prostate**, v. 77, n. 6, p. 573-583, 2017. Doi: 10.1002/pros.23295

SIRAVEGNA, G. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. **Nat. Rev. Clin. Oncol**, v. 14, n. 9, p. 531–548, 2017. Doi: 10.1038/nrclinonc.2017.14

OVERMAN, M. J. et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? **J Clin Oncol**, v. 31, n. 1, p. 17-22, 2013. Doi: 10.1200/JCO.2012.43.1718

MARRUGO-RAMÍREZ. Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 10, p. 2877, 2018. Doi:10.3390/ijms19102877

DE RUBIS, G; KRISHNAN, S. R.; BEBAWY, M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. **Trends Pharmacol Sci**, v. 40, n. 3, p. 172-186, 2019. Doi: 10.1016/j.tips.2019.01.006

FERNANDEZ-LAZARO, D. et al. Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers. **Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 215, 2020. Doi:10.3390/diagnostics10040215

LIM, L.P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769-73, 2005. Doi: 10.1038/nature03315.

GARCIA, D. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsi-6 and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, v. 18, n. 10, p. 1139-46, 2011. Doi: 10.1038/nsmb.2115

WANG, Z. The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. **Methods Mol Biol**, v. 676, p. 211-23, 2011. Doi: 10.1007/978-1-60761-863-8_15

THOMSON, D. W. et al. On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e55214, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0055214

YOO, J.; HAJJAR, R. J.; JEONG, D. Generation of Efficient miRNA Inhibitors Using Tough Decoy Constructs. **Methods Mol Biol**, v. 1521, p.41-53, 2017. Doi: 10.1007/978-1-4939-6588-5_3

GORUR, A. et al. ncRNA therapy with miRNA-22-3p suppresses the growth of triple-negative breast cancer. **Mol Ther Nucleic Acids**, v. 23, p. 930-943, 2021. Doi: 10.1016/j.omtn.2021.01.016

EVANGELISTA, A. et al. Integrated analysis of mRNA and miRNA profiles revealed the role of miR-193 and miR-210 as potential regulatory biomarkers in different molecular subtypes of breast cancer. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 76, 2021. Doi: 10.1186/s12885-020-07731-2

OZAWA, P. M. M. et al. Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 172, n. 3, p. 713-723, 2018. Doi: 10.1007/s10549-018-4925-5

GOMIG, T. H. B. et al. Quantitative label-free mass spectrometry using contralateral and adjacent breast tissues reveal differentially expressed proteins and their predicted impacts on pathways and cellular functions in breast cancer. **J Proteomics**, v. 199, p. 1-14, 2019. Doi: 10.1016/j.jprot.2019.02.007

DUTTAGUPTA, R. et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. **PLoS One**, v. 6, n. 6, e20769, 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0020769

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. **J Exp Med**, v. 103, n. 5, p. 653-66, 1956. Doi: 10.1084/jem.103.5.653

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v.1, n. 5, p. 2315-9, 2006. Doi: 10.1038/nprot.2006.339.

CHEN, X. et al. SP1-induced lncRNA-ZFAS1 contributes to colorectal cancer progression via the miR-150-5p/VEGFA axis. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 10, p. 982, 2018. Doi: 10.1038/s41419-018-0962-6

IACONA, J. R. LUTZ, C. S. miR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 10, n. 4, e1533, 2019. Doi: 10.1002/wrna.1533

KE, L. et al. miR-142-5p promotes cervical cancer progression by targeting LMX1A through Wnt/ β -catenin pathway. **Open Med** (Wars), v. 16, n. 1, p. 224-236, 2021. Doi: 10.1515/med-2021-0218

ZHOU, C. et al. Exosome-derived miR-142-5p remodels lymphatic vessels and induces IDO to promote immune privilege in the tumour microenvironment. **Cell Death Differ**, v. 28, n. 2, p.715-729, 2021. Doi: 10.1038/s41418-020-00618-6.

XU, W.; WANG, W. MicroRNA-142-5p modulates breast cancer cell proliferation and apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog. **Mol Med Rep**, v. 17, n. 6, p. 7529-7536, 2018. Doi: 10.3892/mmr.2018.8812

YU, W. et al. MiR-142-5p Acts as a Significant Regulator Through Promoting Proliferation, Invasion, and Migration in Breast Cancer Modulated by Targeting SORBS1. *Technol Cancer Res Treat.*, v. 18:1533033819892264, 2019. Doi: 10.1177/1533033819892264

LI, H. et al. refMiR 142 5p inhibits cell invasion and migration by targeting DNMT1 in breast cancer. **Oncol Res**. Doi: 10.3727/096504021X16274672547967

ROSHANRAVAN, N. et al. Effects of oral butyrate and inulin supplementation on inflammation-induced pyroptosis pathway in type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Cytokine**, v. 131:155101, 2020. Doi: 10.1016/j.cyto.2020.155101

LEI, B. et al. NF- κ B-Induced Upregulation of miR-146a-5p Promoted Hippocampal Neuronal Oxidative Stress and Pyroptosis via TIGAR in a Model of Alzheimer's Disease. **Front Cell Neurosci**, v. 15:653881, 2021. Doi: 10.3389/fncel.2021.653881

CHELESCHI, S. et al. MicroRNA Mediate Visfatin and Resistin Induction of Oxidative Stress in Human Osteoarthritic Synovial Fibroblasts Via NF- κ B Pathway. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 20, p. 5200, 2019. Doi: 10.3390/ijms20205200

BHAUMIK, D. et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 42, p.5643-7, 2008. Doi: 10.1038/onc.2008.171

NIEDZWIECKI, S. et al. Serum levels of circulating miRNA-21, miRNA-10b and miRNA-200c in triple-negative breast cancer patients. **Ginekol Pol**, v. 89, n. 8, p. 415-420, 2018. Doi: 10.5603/GP.a2018.0071

GLORIEUX, C. et al. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. **Free Radic Biol Med**, v. 87, p. 84-97, 2015. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017

HAQUE, R. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e42542, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0042542

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol**, v. 5, n. 1, p. 5-23. Doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.003.

LEHMAN, C.D. et al. National Performance Benchmarks for Modern Screening Digital Mammography: Update from the Breast Cancer Surveillance Consortium. **Radiology**, v. 283, n. 1, p. 49-58, 2017. DOI: 10.1148/radiol.2016161174

RAPOSO, G. STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J. Cell Biol.**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013. Doi: 10.1083/jcb.201211138

ANDERSEN, G. B. TOST, J. Circulating miRNAs as Biomarker in Cancer. **Recent Results Cancer Res**, v. 215, p. 277-298, 2020. Doi: 10.1007/978-3-030-26439-0_15

8. APÊNDICE

8.1 APÊNDICE 1 – Artigo: *Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free miRNAs as biomarkers*

Artigo de revisão intitulado “*Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free miRNAs as biomarkers*” publicado em setembro de 2020 na revista Translational Research (FI = 7,012).

Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free microRNAs as biomarkers



PATRICIA MIDORI MUROBUSHI OZAWA¹, TAYANA SCHULTZ JUCOSKI¹, EVELYN VIEIRA, TAMYRES MINGORANCE CARVALHO, DANIELLE MALHEIROS, and ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO

CURITIBA, BRAZIL

Improvement of breast cancer (BC) patient's outcome is directly related to early detection. However, there is still a lack of reliable biomarkers for diagnosis, prognosis and, treatment follow up in BC, leading researchers to study the potential of liquid biopsy based on circulating microRNAs (c-miRNAs). These c-miRNAs can be cell-free or associated with extracellular vesicles (EVs), and have great advantages such as stability in biofluids, noninvasive accessibility compared to current techniques (core-biopsy and surgery), and expression associated with pathogenic conditions. Recently, a new promising field of EV-derived miRNAs (EV-miRNAs) as cancer biomarkers has emerged, receiving special attention due to their selective vesicle sorting which makes them accurate for disease detection. In this review, we discuss new findings about c-miRNA and their potential as biomarkers for BC diagnosis, prognosis, and therapy. Additionally, we address the impact of limitations associated with the standardization of analysis techniques and methods on the implementation of these biomarkers in the clinical setting. (Translational Research 2020; 223:40–60)

Abbreviations: BC = breast cancer; c-miRNAs = circulating microRNAs; cf-miRNAs = cell-free microRNAs; EVs = extracellular vesicles; EV-miRNAs = EV-derived miRNAs; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; ERBB2 = human epidermal growth factor receptor 2; TNBC = triple negative breast cancer; CTCs = circulating tumor cells; CA15-3 = cancer antigen 15-3; CEA = carcinoembryonic antigen; RANTES/CCL5 = chemokine (C–C motif) ligand 5; OPN = osteopontin; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1; AUC = area under the curve; RT-qPCR = reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; CT = controls; OS = overall survival; dPCR = digital PCR; NGS = next generation sequencing

¹Co-first authors: equal contribution in this paper.

From the Postgraduate Program in Genetics, Genetics Department, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil.

Submitted for Publication May 14, 2019; received submitted March 31, 2020; accepted for publication April 7, 2020.

Reprint requests: Enilze M.S.F.Ribeiro, Genetics Department, Federal University of Parana, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, Jardim das Americas, Curitiba, PR 81530-000 Brazil. E-mail address: enilzeribeiro@gmail.com.

1931-5244/\$ - see front matter

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.002>

BACKGROUND

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed cancer in females and the leading cause of death by cancer worldwide, with the mortality rate predicted to reach around 626,679 deaths worldwide in 2018.¹ This cancer can be classified in several ways, one of the methods of clinical evaluation being the immunohistochemistry classification.² According to this classification, BC is stratified based on the expression of 4 main protein markers – estrogen receptor (ER), progesterone, receptor (PR), the proliferation marker Ki-67, and

human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2, also known as HER2). This classification includes: luminal A (ER+, PR+, HER2–, Ki-67 low), luminal B (ER+, PR+/-, HER2+/-, Ki-67 high), HER2 overexpression (ER–, PR–, HER2+), and triple negative (ER–, PR–, HER2–).² These subtypes are closely related to the prognosis and outcomes of BC patients, with triple negative breast cancer (TNBC) presenting poor prognosis in comparison with other subtypes.³

The ability to monitor tumor progression and response to treatment without the need for an invasive biopsy has been a long-standing goal of BC management, as well as to other types of cancer.^{4–8} Based on this, the search for novel biomarkers for diagnosis, prognosis, recurrence, progression and treatment follow up has increased.^{9, 10} Several studies suggest that miRNAs have the potential to be used as biomarkers, since they can identify BC patients over healthy individuals, not only when analyzed in tissue,^{11–13} but also when tested in circulation (c-miRNA).^{10, 14–17} MiRNAs are small noncoding RNAs with 21–25 nucleotides, acting as gene expression regulators at the post-transcriptional level,¹⁸ and being known to regulate more than 60% of the human genome.¹⁹ miRNAs are also responsible for cellular communication and have been implicated in a plethora of biological processes including proliferation, programmed cell death, and differentiation.²⁰ They have also been associated with diseases, including cancer,²¹ and are now being considered potential liquid biopsy biomarkers.

Liquid biopsy relies on quantification of molecules, such as proteins, DNA, and RNA, released by normal and tumor cells into the body fluids. These molecules can be used as biomarkers to indicate the presence of cancer,^{22, 23} determine prognosis,²⁴ distinguish subtypes,²⁵ and establish recurrence following treatment.²⁴ Likewise, c-miRNAs are considered excellent candidates for noninvasive biomarkers in liquid biopsy (Fig 1) since they are resistant to endogenous RNase,²⁶ being highly stable extracellularly.

The levels of c-miRNAs have been investigated from different sources, such as plasma,²⁷ serum,²⁸ and whole blood.²⁹ Additionally, they are derived from circulating tumor cells (CTCs), cell-free miRNAs (cf-miRNAs), apoptotic bodies, or from extracellular vesicles (EV-miRNAs), such as exosomes and microvesicles.^{26, 30} Cf-miRNAs can be found outside cells, complexed with high-density lipoproteins,³¹ Argonaute 2 protein,²⁶ and other RNA binding proteins.³² Alternatively, EV-miRNAs can also be found outside cells, packaged inside vesicles, which differ in size and biogenesis. Apoptotic bodies are the biggest vesicles, ranging from 1 to 5 μ m in diameter³³ and originate from budding of apoptotic cells.³⁴ Exosomes are small

vesicles with a size ranging from 40 to 100 nm formed from the fusion process between plasma and endosomal membranes,³⁵ while microvesicles have bigger sizes (100–1000 nm) and originate from protuberances in the plasmatic membrane.³⁶ miRNAs are fitting and feasible alternative to be explored as noninvasive clinical biomarkers for early disease³⁷ as compared to a standard tumor biopsy, with the advantage of being a minimally invasive method. Furthermore, the expression levels of c-miRNAs are the hallmark of pathogenic conditions and can be used as liquid biopsy to reveal signs of disease, being potentially useful for diagnosis, identification of metastasis,³⁸ and drug resistance.^{39, 40} Only few studies have questioned the value of c-miRNAs in BC patients as predictive biomarkers⁹ and the establishment of an accurate and reliable panel of c-miRNAs for BC is still challenging and innovative. Based on this evidence, we propose a review to discuss the state of the art of c-miRNAs, both cf-miRNAs and EV-miRNAs, as diagnosis, prognosis, and therapy biomarkers in BC. We also address methodological and technical limitations that are hindering the clinical implementation of these biomarkers.

Circulating miRNAs in BC diagnosis. The current gold standard for BC diagnosis is mammography, which exhibits high specificity (over 95%) but a lack of sensitivity (67%–95%) and has different performance according to age,⁴¹ breast density,⁴² and professional experience.⁴³ In the search for other biomarkers for BC diagnosis, researchers described the potential use of serum biomarkers to diagnose BC, including cancer antigen 15-3 (CA15-3), carcinoembryonic antigen (CEA),⁴⁴ chemokine (C–C motif) ligand 5 (RANTES/CCL5),⁴⁵ osteopontin,^{46, 47} and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). However, Kazarian et al⁴⁸ reviewed 9 serum markers, including some mentioned before, and showed that none of them were effective in predicting BC, in addition to a lack of consistent change in levels over time. This lack of appropriate biomarkers for BC diagnosis led researchers to investigate the use of other molecules, with several studies featuring c-miRNAs as potential liquid biopsy biomarkers for BC.

The release of miRNAs in the blood circulation of BC patients is known, but the origin of these miRNAs remains unclear. Some studies claim that the profile of c-miRNAs matches the one from tumors,^{12, 49} but there are others suggesting that only selected miRNAs are released into the circulation, being especially associated with EVs.^{38, 50–53} The selective sorting of miRNAs can explain why the expression levels of c-miRNAs usually do not correspond entirely to the miRNA profile of tumor cells.^{11, 54, 55} Nonetheless, researchers seem to agree that the alterations in c-miRNAs levels can identify BC.

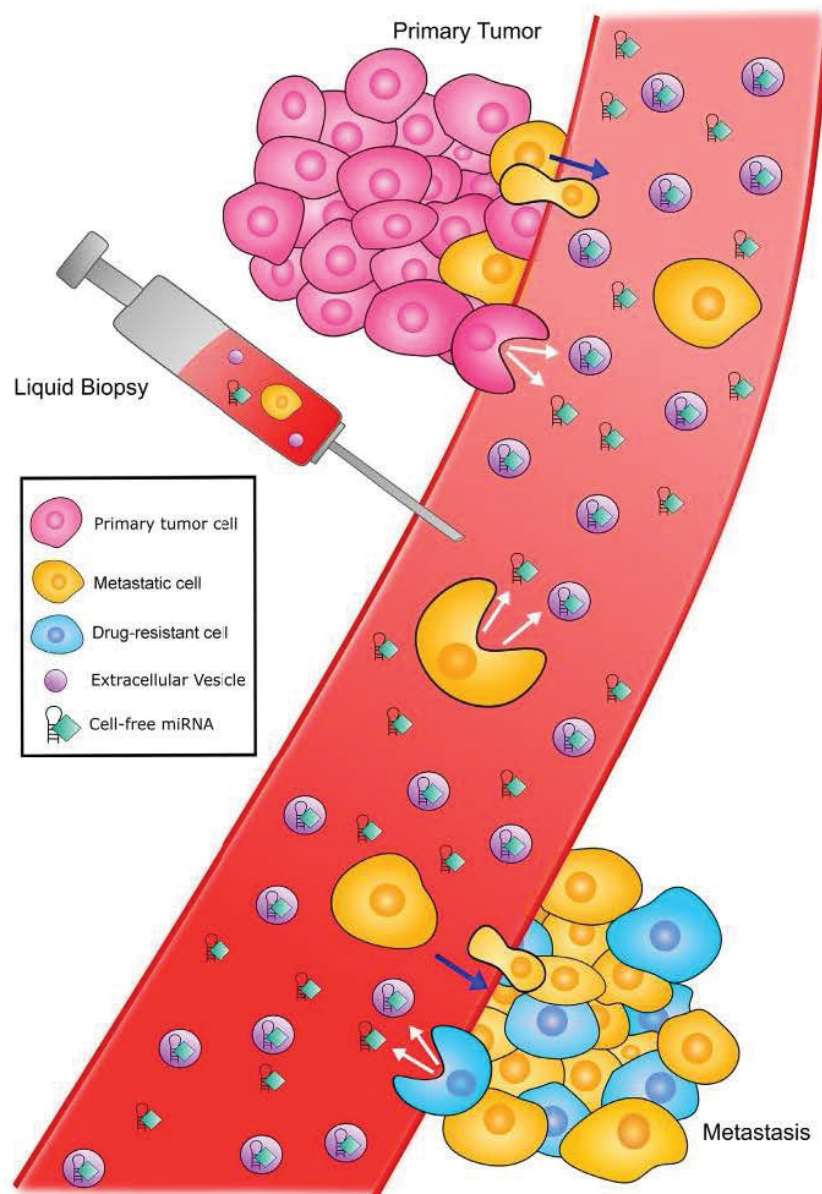


Fig 1. Potential sources of c-miRNAs for liquid biopsy in BC. The release of c-miRNAs from several sources involved in cancer pathogenesis, such as primary tumor cells, metastatic cells and drug resistant cells, might be useful as biomarkers. These c-miRNAs can be cell-free or being present inside EVs, and can be obtained using the liquid biopsy based on blood analysis.

Several c-miRNAs have been described as useful single biomarkers for BC diagnosis, and here we will focus on the ones that were described by more than 2 studies. In addition, a complete list of the reviewed miRNAs suggested as BC diagnosis biomarkers can be found in [Table I](#).

Cf-miRNAs in BC diagnosis. One of the first c-miRNA studied as a BC biomarker was miR-195. A study by Heneghan et al.⁵⁶ described its expression, together with let-7a, as being significantly higher in whole

blood of BC patients compared to controls. Another study from the same research group⁶⁵ confirmed the accuracy of miR-195 overexpression (area under the curve [AUC] = 0.937; sensitivity = 87.7%, specificity = 91%) to detect only BC patients in comparison with a cohort constituted of patients with other types of cancer and controls. Likewise, a remarkable overexpression (fold change = 11.9) of miR-195 in serum of BC patients compared with controls was verified in another study by Hagrass et al.¹⁵ In addition, these

Table 1. c-miRNAs associated with diagnosis in BC

miRNAs	Source	Type	Method	Cohort	Validation phase	Reference
<i>Up-regulated</i>						
Let-7a	Whole blood	Circulating	RT-qPCR	83 BC patients, 44 controls	Sensitivity of 77.6% specificity 100% AUC=0.90–0.91	(56)
mir-1	Serum	Tissue/circulating	RT-qPCR	32 BC patients, 22 controls + validation 132 BC patients, 101 controls		(11)
mir-10b	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls		(17)
	Serum	Circulating	RT-qPCR	120 BC patients, 50 controls		(15)
mir-16	Plasma	Tissue/circulating	Microarray + RT-qPCR	5 BC patients, 5 controls (microarray) + 170 BC patients, 100 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.912; AUC = 0.809	(12)
mir-19a	Serum	Circulating	RT-qPCR	63 BC patients, 21 controls		(57)
mir-19b-3p	Serum	Exosomes	RT-qPCR	32 BC patients, 32 controls		(58)
mir-20b-5p	Serum	Exosomes	RT-qPCR	32 BC patients, 32 controls		(58)
mir-21	Plasma	Tissue/circulating	RT-qPCR	58 BC patients, 40 controls		(49)
	Plasma	Circulating	RT-qPCR	14 BC patients, 8 controls		(59)
	Serum	Circulating	RT-qPCR	89 BC patients, 55 controls	AUC = 0.929, sensitivity = 87.6%, specificity = 87.3%	(60)
	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls		(17)
	Plasma	Tissue/circulating	Microarray + RT-qPCR	5 BC patients, 5 controls (microarray) + 170 BC patients, 100 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.809	(12)
	Serum	Tissue/circulating	RT-qPCR	100 BC patients, 20 controls	AUC = 0.933	(13)
	Blood	Circulating	Meta-analysis	438 BC patients, 228 controls	AUC = 0.89, sensitivity = 79%, specificity = 85%	(61)
	Plasma					
mir-24	Serum	Circulating	RT-qPCR	63 BC patients, 21 controls		(57)
mir-34a-5p	Serum	Circulating	RT-qPCR	120 BC patients, 32 controls		(62)
mir-92a	Serum	Tissue/circulating	RT-qPCR	32 BC patients, 22 controls + validation 132 BC patients, 101 controls	AUC = 0.90–0.91	(11)
	Serum	Exosomes	RT-qPCR	32 BC patients, 32 controls		(58)
	Plasma					
mir-106a	Serum	Circulating	Meta-analysis	438 BC patients, 228 controls	AUC = 0.89, sensitivity = 79%, specificity = 85%	(61)
	Plasma					
mir-125b	Plasma	Tissue/circulating	RT-qPCR	58 BC patients, 40 controls		(49)
	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls		(17)
mir-133	Serum	Tissue/circulating	RT-qPCR		AUC = 0.90–0.91	(11)

(continued on next page)

Table I. (Continued)

miRNAs	Source	Type	Method	Cohort	Validation phase	Reference
mir-134	Plasma Serum	Circulating Circulating	RT-qPCR Microarray	32 BC patients, 22 controls + validation 132 BC patients, 101 controls 18 BC patients, 8 controls 23 BC patients, 9 controls	—	(59) (9)
mir-142-5p	Plasma Serum	Extracellular vesicle	Sequencing and RT-qPCR	18 BC patients, 10 controls (sequencing) + 31 BC patients, 16 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.7964, sensitivity = 87.10%, specificity = 81.25%	(75)
mir-145	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls	—	(17)
mir-150-3p	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	—	(9)
mir-155	Plasma Serum	Tissue/circulating Circulating	RT-qPCR RT-qPCR RT-qPCR	58 BC patients, 40 controls 59 BC patients, 29 controls 103 BC patients, 55 controls	— — AUC = 0.801, sensitivity = 65.0%, specificity = 81.8%	(49) (63) (64)
mir-181b	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls	—	(17)
mir-188-5p	Serum	Circulating	RT-qPCR	63 BC patients, 21 controls	—	(57)
	Plasma	Circulating	RT-qPCR	120 BC patients, 50 controls	—	(15)
		Circulating	RT-qPCR	63 BC patients, 21 controls	—	(57)
		Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	—	(9)
mir-191	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls	—	(17)
mir-195	Whole blood	Circulating	RT-qPCR	83 BC patients, 63 controls	AUC = 0.937, sensitivity = 87.7%, specificity = 91%	(65)
	Whole blood	Tissue/Circulating	RT-qPCR	83 BC patients, 44 controls	Sensitivity = 85.5%, specificity = 100%	(56)
mir-202	Serum	Circulating	RT-qPCR	120 BC patients, 50 controls	—	(15)
	Whole blood	Circulating	Microarray + RT-qPCR	48 BC patients, 57 controls (microarray) + 24 BC patients, 24 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.68	(29)

(continued on next page)

Table 1. (Continued)

miRNAs	Source	Type	Method	Cohort	Validation phase	Reference
miR-320a	Serum	Extracellular vesicles	Sequencing and RT-qPCR	8 BC patients, 10 controls (sequencing) + 31 BC patients, 16 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.8063, sensitivity = 93.33% specificity = 68.75% AUC = 0.66	(75)
miR-376c	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	10 BC patients, 10 controls (microarray) + 127 BC patients, 80 controls (RT-qPCR)	–	(66)
miR-382	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls	–	(17)
miR-424-5p	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	–	(9)
miR-425	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	10 BC patients, 10 controls (microarray) + 15 BC patients, 15 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.83; AUC = 0.99	(67)
miR-483-5p	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	–	(9)
miR-484	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	–	–	(68)
miR-589	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	10 BC patients, 10 controls (microarray) + 15 BC patients, 15 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.78; AUC = 0.85	(67)
miR-642b-3p	Serum	Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	–	(9)
miR-762	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	–	(9)
miR-1202	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	–	(9)
miR-1207-5p	Serum	Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	–	(9)
miR-1225-5p	Serum	Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	–	(9)
miR-1290	Serum	Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	–	(9)
miR-1914-3p	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	–	(9)
miR-3141	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	–	(9)
miR-3652	Serum	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	–	(9)

(continued on next page)

Table I. (Continued)

miRNAs	Source	Type	Method	Cohort	Validation phase	Reference
mir-4270	Serum Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	23 BC patients, 9 controls (microarray) + 46 BC patients and 14 controls (RT-qPCR)	—	(9)
mir-4281	Serum Plasma	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	—	(9)
mir-4298	Serum Plasma	Circulating	Microarray	23 BC patients, 9 controls	—	(9)
miR-4433b	Serum	Extracellular vesicles	Sequencing and RT-qPCR	8 BC patients, 10 controls (sequencing) + 31 BC patients, 16 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.794, sensitivity = 87.10%, specificity = 75%	(75)
<i>Down-regulated</i>						
let-7c	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	10 BC patients, 10 controls (microarray) + 15 BC patients and 15 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.78 (microarray), AUC = 0.85 (RT-qPCR)	(67)
let-7d	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	10 BC patients, 10 controls (microarray) + 15 BC patients, 15 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.83; AUC = 0.99	(67)
mir-27a	Plasma	Circulating	RT-qPCR	137 BC patients, 28 controls	AUC = 0.745	(69)
mir-30a	Plasma	Circulating	Microarray/sequencing + ddpcr	18 BC patients (microarray) + 20 BC patients (ddPCR)	AUC = 0.755, sensitivity = 74%, specificity = 65.6%	(70)
mir-34	Serum	Circulating	RT-qPCR	120 BC patients, 50 controls	—	(15)
mir-92a	Serum	Tissue/circulating	RT-qPCR	100 BC patients, 20 controls	AUC = 0.933 and AUC = 0.923	(13)
mir-126	Plasma	Tissue/circulating	RT-qPCR	58 BC patients, 40 controls	—	(49)
mir-181-a-5p	Serum	Circulating	Microarray/sequencing + ddpcr	18 BC patients (microarray) + 20 BC patients (ddPCR)	—	(71)
mir-199a	Plasma	Tissue/circulating	RT-qPCR	58 BC patients, 40 controls	—	(49)
mir-299-5p	Serum	Circulating	RT-qPCR	75 BC patients, 20 controls	—	(72)
mir-335	Plasma	Tissue/circulating	RT-qPCR	58 BC patients, 40 controls	—	(49)
mir-411	Serum	Circulating	RT-qPCR	75 BC patients, 20 controls	—	(72)

Abbreviations: AUC, area under the curve; BC, breast cancer; ddPCR, droplet digital PCR; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction.

authors also found significant increase in expression of miR-10b and miR-155, as well as a significant downregulation of miR-34a, in BC patients compared with controls.¹⁵ Although another study from Mar-Aguilar et al confirmed the overexpression of miR-10b in the serum of BC patients,¹⁷ Heneghan et al⁵⁶ reported no association of this miRNA with BC. Similarly, the levels of miR-34a were also discrepant compared to the results described by Eichelser et al⁶² that showed a significant up-regulation of this miRNA in BC patients. Interestingly, a detailed analysis of these studies revealed that both used reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR), with similar cohort sizes, that is, 120 BC patients and 50 controls¹⁵ vs 120 BC patients and 32 CT.⁶²

Notably, miR-155 has been described with a consistent expression pattern, with most reports describing it as an oncomiR due to its significant overexpression in BC when compared with controls in serum^{15, 17, 57, 63, 64} and plasma.⁴⁹ According to Sun et al,⁶⁴ this miRNA has a high accuracy as a diagnostic tool, presenting an AUC = 0.801 (sensitivity = 65.0%, specificity = 81.8%), which is better than CA 15-3 (sensitivity = 4.9%, specificity = 99.1%) and CEA (sensitivity = 7.8%, specificity = 98.2%). Furthermore, the levels of this miRNA showed a significant reduction in serum after surgery and chemotherapy treatments, providing evidence that it is secreted in cancer conditions. Only a few reports have shown a non-significant differential expression of this miRNA related to BC.^{9, 56}

Another c-miRNA that is frequently mentioned is miR-21. This miRNA is also consistently overexpressed in BC patients compared to controls and has been described as a good biomarker in serum,^{13, 17, 60} plasma,^{12, 49, 59} and plasma derived EVs.²² Interestingly, its expression has also been described as correlated between tumor and plasma¹² and between tumor and serum.¹³ The diagnostic accuracy for miR-21 varies from AUC = 0.89 (sensitivity = 79%, specificity = 85%)⁶¹ to AUC = 0.929 (sensitivity = 87.6%, specificity = 87.3%),⁶⁰ with the latter study describing a higher sensitivity even compared with 2 markers for BC, CA 15-3 (22.5%) and CEA (15.7%).⁶⁰

Although single c-miRNAs seem to present adequate accuracy for detecting BC, several studies have suggested that c-miRNAs panels can be even better as diagnostic biomarkers (Table II). Among the miRNA-panels, the ones with higher values of accuracy were from Mar-Aguilar et al¹⁷ (AUC = 0.987, sensitivity = 97.6%, specificity = 100%), Shimomura et al⁷³ (AUC = 0.971, sensitivity = 97.3%, specificity = 82.9%), and Cui et al⁷⁴ (AUC = 0.971, sensitivity = 96.7%, specificity = 97.2%).

Mar-Aguilar et al¹⁷ screened the serum of BC patients and controls from a Mexican population and found that a panel constituted of miR-145, miR-155, and miR-382 have the best combinatory fit for diagnosis of BC. Conversely, the study from Shimomura et al⁷³ used a different approach, collecting serum samples from patients with BC, patients with other types of cancer, and patients with benign disease. They also used non-cancer controls and divided each group into training cohort and test cohort (does not comprehend other types of cancer). The comparison identified a combination of 5 miRNAs (miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p, and miR-6875-5p), all of which were overexpressed in BC and provided the best discrimination curve in both the training cohort and the test cohort (AUC = 0.8971; sensitivity = 87.8%, specificity = 78.5% in the test phase). This approach has the advantage of selecting miRNAs specific to BC conditions, excluding the miRNAs that might be related to other cellular processes in cancer patients, such as inflammation. Likewise, another innovative type of analysis based on neural cascade modeling was adopted by Cui et al⁷⁴ in order to reanalyze the dataset from the previous study.⁷³ They found that a panel composed of 3 miRNAs – miR-1246, miR-6756-5p, and miR-8073 was capable of diagnosing BC. As a result, this study demonstrated that suitable modeling could reduce the number of miRNAs required in a biomarker panel without compromising prediction accuracy, which increases the feasibility of using miRNA panels for BC early detection as stage I tumors.

Recently, an enlightening study by Grimaldi and Incoronato⁸³ compared the sensitivity, specificity, and consistent expression of miRNAs between tissue and blood from several studies. Interestingly, they showed that some of the most frequently observed c-miRNAs associated with BC (miR-21, miR-155, miR-223, miR-146a, miR-126, and miR-145) were the most nonspecific BC-associated miRNAs. According to their findings there are other c-miRNAs specifically associated with early diagnosis of BC, but they were only reported in one study. Importantly, the expression levels of majority of miRNAs associated with BC, in tissue and circulation (c-miRNAs), did not match, which draws attention to the importance of further studies focusing on selectively sorted miRNAs, such as EV-miRNAs.

EV-miRNAs in BC diagnosis. The pioneer study from Hannafon et al²² screened miRNAs enriched in exosomes from BC cell lines and compared the levels of the more abundant miRNAs in plasma-derived exosomes from patients. Interestingly, they found a corresponding overexpression of miR-21 and miR-1246 in these plasma samples, making it the first study to suggest a panel of EV-miRNA for BC diagnosis. Likewise, a recent study

Table II. Panels of c-miRNAs suggested for BC diagnosis

Panels of miRNAs	Source	Type	Method	Cohort	Validation phase	Reference
miR-148b, miR-409-3p and miR-801	Plasma	Circulating	Microarray + RT-qPCR	10 BC patients, 10 controls (microarray) + 127 BC patients, 80 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.69, sensitivity = 70%, specificity = 55%	(66)
miR-142-5p, miR-320a and miR-4433b	Serum	Circulating	Sequencing + RT-qPCR	18 BC patients, 10 controls (sequencing) + 31 BC patients, 16 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.8387, sensitivity = 93.33%, specificity = 68.75%	(75)
miR-16, miR-25, miR-222 and miR-324-3p	Serum	Circulating	Sequencing + RT-qPCR	—	AUC = 0.928, sensitivity 0.921, specificity = 0.934	(76)
miR-145, miR-155 and miR-382	Serum	Circulating	RT-qPCR	61 BC patients, 10 controls	AUC = 0.987, sensitivity = 97.6%, specificity = 100%	(17)
miR-145* and miR-451	Plasma	Tissue/circulating	Microarray + RT-qPCR	5 BC patients, 5 controls (microarray) + 70 BC patients, 50 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.931, sensitivity = 83%, specificity = 93%	(12)
miR-15a, miR-18a, miR-107, miR-133a*, miR-139-5p*, miR-143*, miR-145*, miR-365*, and miR-425	Serum	Circulating	RT-qPCR	48 BC patients, 24 controls, validation 60 BC patients, 51 controls	AUC = 0.665, sensitivity = 83.3%, specificity = 41.2%	(16)
miR-133a and miR-148b	Plasma	Circulating	RT-qPCR	52 BC patients, 35 controls, validation 50 BC patients, 50 controls	AUC = 0.86	(77)
miR-16, miR-19b, and miR-22, miR-103*, miR-107*, miR-148a, let-7d* and let-7f*	Plasma	Circulating	RT-qPCR	41 BC patients, 45 controls, validation 108 BC patients, 88 controls	AUC = 0.81, sensitivity = 91%, specificity = 49%	(78)
miR-29c, miR-199a and miR-424	Serum	Circulating	RT-qPCR	25 BC patients, 20 controls, validation 76 BC patients, 52 controls	AUC = 0.901, sensitivity = 77.6%, specificity = 84.6%	(79)
miR-21 and miR-1246	Cell culture Plasma	Exosomes	Sequencing + RT-qPCR	16 BC patients, 16 controls	AUC = 0.73	(22)
miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-5861-	Serum	Circulating	Microarray + RT-qPCR	74 BC patients, 2007 controls (microarray) + 1206 BC patients, 1394 controls (RT-qPCR)	AUC = 0.971, sensitivity = 97.3%, specificity = 82.9%	(73)

(continued on next page)

Table II. (Continued)

Panels of miRNAs	Source	Type	Method	Cohort	Validation phase	Reference
5p and miR-6875-5p	–	Circulating	Microarray	1288 BC patients, 2686 controls	AUC = 0.971, sensitivity = 96.7%, specificity = 97.2%	(74)
miR-1246, miR-6756-5p and miR-8073	Serum	Circulating	RT-qPCR	24 BC patients, 24 controls (training phase), 150 BC patients, 148 controls (testing phase), 30 BC patients, 30 controls (validation)	AUC = 0.937, sensitivity = 87%, specificity = 89%	(58)
miR-19b-3p, miR-20b-5p, and miR-92a-3p and miR-106a-5p	Plasma	Circulating	RT-qPCR	24 BC patients, 24 controls (training phase), 146 BC patients, 146 controls (testing phase), 30 BC patients, 30 controls (validation)	AUC = 0.889, sensitivity = 82%, specificity = 79%	(58)
miR-20b-5p, miR-92a-2-5p, miR-106a-3p and miR-106a-5p,						
miR-130b-5p, miR-151a-5p, miR-206, and miR-222-3p	Serum	Circulating	RT-qPCR	9 BC patients (RT-qPCR), 24 BC patients, 24 controls (training phase), 58 BC patients, 44 controls (validation)	AUC = 0.93 (sensitivity = 84.3%, specificity = 83.3%)	(10)
miR-3124-5p, miR1184, miR-4423-3p, miR-4529-3p, miR-7855-5p, and miR-4446-3p	Serum	Circulating	Microarray	48 BC patients		(80)
miR-923 and miR-510-5p	Plasma	Circulating	ddPCR	253 BC patients, 57 controls	AUC: 0.762 (73.7% sensitivity and 67.2% specificity)	(81)
miR-188-3p, miR-500a-5p and miR-501-5p	Plasma	Circulating	RT-qPCR	200 BC patients, 190 controls	AUC = 0.805	(82)
miR-188-3p, miR-501-3p, miR-502-3p, miR-532-3p, and miR-532-5p	Serum	Circulating	RT-qPCR	200 BC patients, 190 controls	AUC = 0.895	(82)

Abbreviations: AUC, area under the curve; BC, breast cancer; ddPCR, droplet digital PCR; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction.
*miRNAs downregulated.

from our group showed that a panel composed of miR-142-5p, miR-320a, and miR-4433b-5p also has an accuracy as BC biomarker (AUC of 0.8387, sensitivity of 93.33% and specificity of 68.75%).⁷⁵

Interestingly, Li et al⁵⁸ investigated the comparison between cf-miRNAs and EV-miRNAs derived from plasma, serum, tumor tissue, and controls. A 3-phase study was performed, with the selection of 4 differentially expressed miRNAs from plasma (miR-20b-5p, miR-92a-2-5p, miR-106a-3p, and miR-106a-5p) and 4 differentially expressed miRNAs from serum (miR-19b-3p, miR-20b-5p, miR-92a-3p, and miR-106a-5p). All these c-miRNAs were overexpressed in BC, with great potential to discriminate patients from controls, presenting AUCs of 0.889 (sensitivity = 82%, specificity = 79%) and 0.937 (sensitivity = 87%, specificity = 89%), respectively. After the last phase, those respective differentially expressed miRNA panels were screened in tissue samples and exosomes from plasma and serum (n = 32 BC vs 32 CT). The comparison with tissue samples showed that only 2 overlapping miRNAs (miR-20b-5p and miR-106a-5p) exhibited the same pattern as the c-miRNAs. Primarily, the expression of exosomal miRNAs from plasma and serum was concordant with the ones from cf-miRNAs, except for the plasma-derived exosomal miR-20b-5p, which was not statistically significant.

Taken together these studies show that there is potential for c-miRNAs as diagnosis biomarkers for BC. However, there is not a consensus about the best c-miRNA to be used for this purpose yet. Some of the limitations that can affect the consistency between studies will be further discussed in the last topic of this article. Nonetheless, the refinement on the approaches to study c-miRNAs, such as analysis of selectively sorted EV-miRNAs, synergized with the dissolution of the limitations associated to these studies will allow for the identification of the best c-miRNA signature for BC diagnosis.

Circulating miRNAs in BC prognosis. Parameters that predict survival or risk of recurrence due to BC, regardless of treatment strategy, establish the patient's prognosis. The evaluation of how the disease will evolve is based on parameters such as tumor grade, lymph node status, hormonal receptors status, and presence of metastasis. The study of the relationship among miRNA levels in blood with survival and recurrence aims to assess the potential use of these molecules as prognostic biomarkers that can ultimately improve patient's survival (Table III).

cf-miRNAs and BC prognosis. The expression levels of c-miRNAs obtained during patient follow up has been explored as biomarkers to predict recurrence in BC. An example is the study of Huo et al⁸⁵ that observed the expression levels of eleven cf-miRNAs between

patients with and without recurrence and concluded that seven miRNAs (miR-21-5p, miR-194-5p, miR-205-5p, miR-375, miR-376c-3p, miR-382-5p, and miR-411-5p) demonstrated a good discriminatory capacity and could be used as recurrence biomarkers for both hormonal positive and TNBC patients.⁸⁵

Parameters as the presence of lymph node or distant metastasis are associated with disease progression and provide important information for prognosis evaluation, influencing the therapeutic approach. Based on this, researchers observed that levels of c-miRNAs^{13, 27, 28, 86-90} were related to metastasis in BC patients. Roth et al⁶³ showed that when the levels of miR-10b, miR-34a, miR-141, and miR-155 were evaluated in serum of patients with primary and metastatic BC, miR-10b, miR-34a, and miR-155 were significantly different between metastatic patients and controls.⁶³ Interestingly, patients with advanced tumors (T3 or T4 stages) had higher levels of miR-34a. Therefore, this study provided evidence that these tumor-associated c-miRNAs are related to tumor progression in BC patients. Similarly, Eichelser et al⁶² observed different serum levels of miR-17 and miR-155 between BC patients with and without metastasis. This study also found an increased level of miR-373 in HER2-tumors as well as lower levels of miR-17 and miR-34a in tumors with PR+/ER-.

Another parameter that influences prognosis is subtype classification of BC patients. This classification is based on immunohistochemistry and molecular parameters, with more aggressive subtypes such as TNBC and HER2+ being associated with poor prognosis, while luminal A and B present a better prognosis.⁹¹ Therefore, many studies focus on evaluating c-miRNAs levels mainly in TNBC tumors.^{27, 92, 93} Considering that TNBC has the worst prognosis among BC subtypes, with early tumor recurrence and poor outcome,⁹⁴ finding a prognostic biomarker for TNBC patients would allow the establishment of optimized treatment regimens that could promote patient's survival. Therefore, Sahlberg et al⁹² proposed a 4 miRNA signature in serum (miR-18b, miR-103, miR-107, and miR-652), capable of predicting recurrence and poor overall survival (OS) in TNBC patients, showing a significant prognostic value when analyzed together. Consequently, patients with high expression of 2 or more miRNAs from the signature showed decreased relapse-free survival and OS. Similarly, Madhavan et al⁹⁵ proposed a prognostic miRNA panel template (PROMPT) with a mix of 16 c-miRNAs associated with OS and recurrence-free survival. Therefore, the combined analysis of c-miRNAs levels can establish a miRNA panel signature, consequently increasing the reliability when assessing patient prognosis,

Table III. c-miRNAs related with prognosis and treatment in BC

miRNAs	Source	Association	Method	Reference
Extracellular vesicles				
<i>Prognosis</i>				
miR-9	cell culture	metastasis, tumor growth	RT-qPCR	(86)
miR-10b	cell culture	induces cell invasion	RT-qPCR	(110)
miR-16	cell culture	antiangiogenic effect	RT-qPCR	(111)
miR-17-5p*, miR-18a-5p*, miR-20b-5p*, miR-29b-3p*, miR-93-5p*, miR-124-3p, miR-130a-3p*, miR-195- 5p*, miR-338-3p, miR-340- 5p, miR-486-5p*	serum	recurrence	miRNA array analysis	(84)
miR20b-5p, miR-92a-2-5p, miR-106a-3p, miR-106a-5p	plasma/serum	tumor grade, ER and HER2 status	RT-qPCR	(58)
miR-21-5p, miR-143-3p, miR- 378e	cell culture	cancer progression, epithe- lial-mesenchymal transition	RT-qPCR	(112)
miR-21, miR-105, miR-222	serum	metastasis, subtype, PR sta- tus, tumor size	RT-qPCR	(113)
miR-141, miR-200c	plasma	metastasis	Nest-qPCR	(89)
miR-142, miR-150-5p, miR- 320a, and miR-443b	serum	subtype	RT-qPCR	(75)
miR-142, miR-320a	serum	tumor size < 20mm	RT-qPCR	(75)
miR-142*, miR-150-5p*	serum	advanced stage	RT-qPCR	(75)
miR-155	plasma	tumor initiation	Nest-qPCR	(114)
miR-200	serum	metastasis	RT-qPCR	(87)
miR-503*	cell culture	decreased cell proliferation and invasion	RT-qPCR	(115)
miR-770	cell culture	metastasis in TNBC	RT-qPCR	(88)
miR-1246	serum	promotes cell proliferation and invasion	RT-qPCR	(116)
<i>Therapy</i>				
miR-17, miR-30a, miR-100, miR-222	cell culture	drug resistance (adriamy- cin, docetaxel)	microarray and RT-qPCR	(102)
miR-20a, miR-23a, miR-24, miR-149, miR-222	cell culture	drug resistance (adriamycin)	microarray and RT-qPCR	(117)
miR-21	serum	neoadjuvant therapy	RT-qPCR	(113)
miR-21, miR-23a, miR-29a, miR-196a miR-222, miR- 452, miR-1246	cell culture	drug resistance (docetaxel)	RT-qPCR	(101)
miR-29a, miR-222	cell culture	drug resistance (adriamy- cin, docetaxel)	RT-qPCR	(104)
miR-134*, miR-370*, miR- 376c*, miR-889*	cell culture	drug sensitivity	TaqMan Low-Density Assays (TLDA), qPCR	(118)
miR-138-5p, miR-210-3p, miR-423-5p, miR-574-3p, miR-3178, miR-4258, miR- 4298, miR-4443, miR- 6780b-3p, miR-7107-5p, miR-744-5p, miR-7847-3p	cell culture	drug resistance (epirubicin, docetaxel, vinorelbine)	RT-qPCR	(103)
miR-221, miR-222	cell culture	drug resistance (tamoxifen)	RT-qPCR	(40, 99)
miR-222	cell culture	drug resistance (adriamycin)	LNA-ELF-FISH	(106, 107)
miR-503*	cell culture	antitumor response to neo- adjuvant chemotherapy	RT-qPCR	(115)
miR-770	cell culture	chemo-resistance in TNBC	RT-qPCR	(88)
miR-1246	serum	resistance	RT-qPCR	(116)
Cell-free				
<i>Prognosis</i>				
miR-10b, miR-34a, miR-141, miR-155	serum	tumor progression	RT-qPCR	(63)

(continued)

Table III. (Continued)

miRNAs	Source	Association	Method	Reference
miR-125b	serum	chemoresistance	RT-qPCR	(130)
miR-155*	serum	therapy	RT-qPCR	(64)
miR-155*, miR-181*, miR-24*, miR-19a*	serum	therapy and surgical resection	RT-qPCR	(57)
miR-205, miR-19a	serum	drug resistance (epirubicin, paclitaxel) in luminal A	RT-qPCR	(109)
miR-210	plasma, cell culture	trastuzumab resistance, surgery	RT-qPCR	(96)
miR-221	plasma	neoadjuvant chemotherapy	RT-qPCR	(131)
miR-451	serum, cell culture	neoadjuvant chemother- apy resistance (epirubicin, docetaxel)	RT-qPCR	(108)
miR-3656*, miR-21–5p*, miR- 505–5p*	plasma	surgery and treatment	microarray and RT-qPCR	(132)
miR-5698, miR-8089	serum	OS (eribulin treatment)	microarray	(128)

Abbreviations: ddPCR, droplet digital PCR; DFS, disease-free survival; PR, progesterone receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; ER, estrogen receptor; nest-PCR, nested PCR; OS: overall survival; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; TNBC, triple negative breast cancer.
*miRNAs downregulated.

which can assist during the decision of the therapeutic approach.

EV-miRNAs and prognosis. The use of EV-miRNAs as biomarker for recurrence has been described in the study of Sueta et al⁸⁴ that analyzed tumor tissue and the levels of EV-miRNAs in patients with and without recurrence events. The study showed 11 differentially expressed EV-miRNAs between these groups, with 4 (miR-17-5p, miR-93-5p, miR-130a-3p, and miR-340-5p) being significantly associated with recurrence.

There are several EV-miRNAs associated with increase in cell motility and metastasis, such as miR-10b,¹¹⁰ miR-200,⁸⁷ miR-200c, and miR-141. miR-770,⁸⁸ miR-21, miR-378, miR-378e, and miR-143,¹¹² In patients, evidence has shown that levels of certain EV-miRNAs are enriched in BC metastatic patients compared to control, such as miR-21 and miR-105.¹¹³ However, only the study of Zhang et al⁸⁹ suggest the use of the EV-miRNAs miR-200c and miR14 as early biomarkers for metastasis.⁸⁹

EV-miRNAs have also been associated with BC subtypes. Our group showed that higher expression of the EV-miRNAs panel miR–142–5p and miR–320a distinguished controls vs luminal A patients (AUC = 0.9410 with 100% sensitivity and 93.80% specificity, for cutoff value of 0.087).⁷⁵ Interestingly, the expression level of miR-150-5p discriminated with accuracy LA and TNBC subtypes (AUC = 0.8667, sensitivity of 80% and specificity of 75%, for a cutoff of 39.380). Additionally, lower expression levels of miR–142–5p and miR–150–5p were associated with advanced tumor grades, while tumors smaller than

20 mm were associated with higher levels of miR–142–5p and miR–320a.⁷⁵

The number of studies providing evidence for the use of c-miRNAs signatures as prognostic biomarkers is increasing. Although no consensus has been reached so far, impairing the translation to the clinical setting, c-miRNAs represent a strong candidate for biomarkers during patient's follow-up. One of the reasons is due to their synchronous alteration with parameters (i.e., metastasis) that could be easily detected during patient's follow-up.

Circulating miRNAs in BC treatment. The treatment approach is based on subtype, tumor stage, and other clinical-histopathological parameters, also considering patients overall health and personal preferences. Importantly, therapy follow-up is essential to observe patient response and recurrence events. In this context, liquid biopsy is an interesting tool to be used in personalized medicine, allowing physicians to choose the best therapy approach based on each patient's tumor subtype and unique characteristics. This minimally invasive method can also be performed several times over the course of the treatment. This is important because the follow-up of c-miRNAs signature could identify metastasis or recurrence before other clinical observations, providing chances to adjust the therapeutic approach in order to increase patient's survival.

Remarkably, levels of blood biomarkers have already been associated with therapy response, drug resistance, and survival. In this context, chemotherapy has been described to increase c-miRNA concentration in the blood of BC patients,^{96, 97} In the same way, several studies (Table III) have demonstrated the relationship

between the levels of a diverse group of c-miRNAs with response and resistance to tamoxifen,^{40, 99} doxorubicin,¹⁰⁰ docetaxel,¹⁰¹⁻¹⁰⁴ dovitinib,¹⁰⁵ adriamycin,^{102, 104, 106, 107} vinorelbine,¹⁰³ epirubicin,^{103, 108, 109} trastuzumab, or lapatinib,¹⁰⁵

Cf-miRNAs in treatment. Gezer et al⁹⁸ showed that plasma levels of cell-free miR-21, miR-195, and miR-221 are affected by neoadjuvant chemotherapy, especially in early-stage tumors. Another parameter that can affect response to therapy is BC subtype, and the classification of subtype based on c-miRNAs levels can direct the decision to the correct treatment approach. A study showed that serum levels of cell-free miR-19a and miR-205 may predict the sensitivity of Luminal A to neoadjuvant treatment with epirubicin plus paclitaxel.¹⁰⁹ The authors analyzed serum of 68 BC patients that received this neoadjuvant chemotherapy, observing an increase in the levels of these cf-miRNAs in resistant patients compared with sensitive patients. Likewise, Muller et al⁹⁷ investigated cell-free miR-21, miR-210, and miR-373 in the serum of HER2+ patients treated with trastuzumab or lapatinib regimes. They found that the levels of these miRNAs were significantly increased in patients before and after neoadjuvant therapy in comparison with controls. Interestingly, miR-21 increase was associated with poor OS independently of therapy regimen, and miR-373 overexpression was associated with advanced tumor stages.

EV-miRNAs in treatment. The altered expression of miRNAs has also been reported in EVs for miR-21 and miR-221/222 which were associated with neoadjuvant chemotherapy, and tamoxifen-resistance in ER+, respectively.^{40, 99, 101} Likewise, Zhong et al¹⁰³ evaluated miRNA levels present in EVs in patients that received chemotherapy with vinorelbine, docetaxel, and epirubicin. They found twelve up-regulated miRNAs (miR-138-5p, miR-210-3p, miR-423-5p, miR-574-3p, miR-744-5p, miR-3178, miR-4258, miR-4298, miR-4443, miR-6780b-3p, miR-7107-5p, miR-7847-3p) after preneoadjuvant chemotherapy that might indicate drug resistance in patients with BC (Table III). Therefore, chemotherapy seems to influence c-miRNA levels and interestingly, it is also frequently associated with drug resistance.

Drug resistance is the main challenge in cancer treatment, especially because many BC patients develop resistance at some point despite the use of the broad spectrum of drug combinations. Notably, alteration in the levels of c-miRNAs seems to be correlated with drug resistance. In this context, liquid biopsy based on c-miRNAs would allow a direct and frequent monitoring of patient's treatment response using blood biomarkers that can help to identify drug resistance, consequently leading to improvement in OS.

Limitations and perspectives. The use of a liquid biopsy based on c-miRNAs for clinical purpose shows great potential. However, there are several limitations hindering the translation to clinical setting. Some of the challenges faced in this area include differences in the cohort size, collection, type of sample, processing, isolation, quantification, and analysis of c-miRNAs. A brief analysis of all the studies mentioned in this review (Tables I-III) suffices to identify these differences, which can be the source of variation among the identified c-miRNA and have been reviewed by many.^{9, 52, 133, 134}

In the analysis of all these studies it is noticeable that only a few of them have a cohort size larger than 100 patients and control^{11, 12, 61, 73, 74} and they do not have a significant c-miRNA overlap. There are several limitations that can account for these variations, such as the type of sample (whole blood, plasma, or serum) and their quantity and quality influence the study's outcome.¹³⁴ Additionally, processing time prior to the RNA extraction is crucial and must be performed within a few hours after collection. Importantly, the delay can alter c-miRNA profile and lead to incorrect interpretation, but the processing time is usually not provided by majority of studies.¹³⁵ Currently, there are commercially available PAXgene Blood RNA Tubes which stabilize RNAs immediately upon collection, minimizing alteration in profiles. Considering the high cost of the implementation of these tubes in a clinical setting, their routine use is uncertain. Another font of variation is the isolation method, which can be specific for EV-miRNAs (eg, exosomes and microvesicles) or for recovery of all types of c-miRNAs together. Initially, the studies used phenol-based and column-based methods that recover total c-miRNA from whole blood, serum, and plasma, which consequently included EV-miRNAs.¹³⁴ Nevertheless, the interest in EV-miRNAs has been increasing and appropriate techniques such as differential centrifugation followed by ultracentrifugation and/or density gradient have been described, as well as precipitation and size-exclusion chromatography methods are also being used.¹³⁶ Interestingly, the sorting of EV-miRNAs seems to be selective and although it has not been described for BC, the potential of EV-miRNAs as biomarkers for other types of cancer has been addressed.^{38, 53}

Currently, there are several approaches used to quantify c-miRNAs, such as microarray, reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), digital PCR, and next-generation sequencing. RT-qPCR is the gold standard method to quantify small amounts of c-miRNA, exhibiting good sensitivity, reproducibility, and accuracy. Another suitable technique is digital PCR, which seems suitable to quantify low-abundant targets, with no need for external calibrators and standard curves. However,

Table IV. Clinical trials with c-miRNAs in breast cancer*

ID	Trial	Primary purpose/Time perspective	Study type	Actual enrollment	Sponsor	Status
NCT02618538	The Andromeda Study: Predictive Value of Combined Criteria to Tailor Breast Cancer Screening.	Cross-Sectional (Follow-Up: 2 years)	Observational	26600 participants	Centro di Riferimento per l'Epidemiologia and la Prev. Oncologica Piemonte	Completed 2019
NCT02065908	Circulating MicroRNA as Biomarker of Cardiotoxicity in Breast Cancer	Prospective	Observational	128 participants	West Pomeranian Cancer Center	Completed 2016
NCT01722851	Circulating miRNAs. IORG 10-11, V2	Prospective	Observational	122 participants	Cancer Trials Ireland	Recruiting since 2012
NCT01612871	Circulating miRNAs as Biomarkers of Hormone Sensitivity in Breast Cancer (MIRHO)	Treatment (Tamoxifen, Letrozole, Anastrozole, Exemestane)	Interventional	39 participants	Institut Claudius Regaud	Completed 2016
NCT03118882	STI.VI. Study: How to Improve Lifestyles in Screening Contexts (STIVI)	Prevention	Interventional	1270 participants	Centro di Riferimento per l'Epidemiologia and la Prev. Oncologica Piemonte	Completed 2014
NCT03255486	Identification and Evaluation of Biomarkers of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy (IDEA SEIN)	Prevention	Interventional	164 participants	Institut régional du Cancer de Montpellier-Montpellier, France	Completed 2016
NCT03779022	MicroRNA and Relevant Biomarkers of Breast Cancer in Patients Undergoing Neoadjuvant Treatment	Prospective	Observational	100 participants	Peking University First Hospital	Recruiting since 2018
NCT03528473	Adapted Physical Activity (APA) in a Breast Cancer Population	Treatment	Interventional	100 participants	University Of Perugia	Recruiting since 2019

*Searched on ClinicalTrials.gov database (September, 2019) using "breast cancer" on "Condition or Disease" and "circulating microRNAs" under "Other terms".

this technique requires many samples and is unable to identify novel unannotated miRNAs. Conversely, RNA-Seq can detect both annotated and unannotated miRNAs and is sensitive, being able to distinguish isomiRs (i.e., miRNAs isoforms). The disadvantages of RNA-seq are the requirement of large amounts of RNA input, of time-consuming protocol, of being more expensive compared with other methods, and the extended need of bioinformatics tools. Usually, microarray and next-generation sequencing approaches are used to perform an initial screening and obtain profiles of c-miRNAs, while RT-qPCR and digital PCR are used to validate levels of some previously selected miRNAs.^{133, 137-139}

As mentioned before, the choice of the quantification and post analysis methods can influence the detected levels of c-miRNAs in liquid biopsy and consequently the interpretation of the results. Few studies show an overlap of miRNAs even when they use a similar approach, with some describing discrepancy in the expression status (up or downregulated) of the same miRNA among studies. This discordance can be related to cohort size, different methods used for sample collection, extraction and quantification steps, and postanalytical approaches. For example, the analysis of the expression level of miR-155 among studies seems discordant.^{28, 49, 57, 60, 62-64, 98, 124} A deep analysis of the methodological approaches shows that most of the studies used RT-qPCR to evaluate c-miRNAs in cell-free serum/plasma but adopted different endogenous control.

The normalization step for RT-qPCR analysis requires the quantification of an endogenous control to compare with the expression levels of the target miRNA. However, the choice of the best endogenous control is always challenging. This happens mostly because circulating miRNAs levels vary according to physiological or pathological states. This is the main reason why they are important for liquid biopsy, but also a key fact that makes the choice of stable endogenous controls challenging. An alternative is to analyze a sample group to find the most stable miRNA and use it as the endogenous control in subsequent analysis. Another strategy is to search in the literature for possible endogenous control, such as RNUs (eg, RNU44 and RNU48), also known as small nucleolar RNAs (SNORD); miRNAs that were used in previous studies (let-7a, miR-16, miR-21, for example); or external controls (eg, cel-miR-39), which are added during the RNA extraction step. Additionally, it is important to consider the biology of each disease, since some miRNAs can exhibit different expression levels according to the tumor type, making the result comparison among studies challenging.^{134,140}

This scenario hinders the establishment of a useful c-miRNA biomarker, which is why it is necessary to establish guidelines to enhance the standardization of

c-miRNA processing and analysis, in order to increase the confidence on c-miRNAs biomarkers. Nevertheless, many c-miRNAs have been investigated in some clinical trials, but the majority have not published any results so far (Table IV). One of the studies with published results was the NeoALTTO clinical trial, in which c-miRNAs were screened and evaluated as potential biomarkers to predict HER2-targeted therapy. In this study, the researchers identified a panel of four c-miRNAs significantly associated with pathologic complete response in the testing set. This result associated to the findings of Mar-Aguilar et al¹⁷ show that panels of c-miRNAs have an increased sensitivity and specificity, when compared to individual c-miRNAs. Interestingly, this signature was able to distinguish patients with the distinct therapeutic regimen (lapatinib, trastuzumab, and lapatinib plus trastuzumab), corroborating findings that showed changes in c-miRNAs after chemotherapy treatment.⁹⁸

The introduction of liquid biopsy based on c-miRNA in clinical routine will combine the current approaches for diagnosis, prognosis, and therapy in BC. One of the main contributions that c-miRNAs can bring to clinical setting is the minimally invasive follow-up that can identify drug resistance, contributing to the reduction of morbidity and mortality and, improving survival.

CONCLUSION

Breast cancer is a heterogeneous disease and exhibits different characteristics that can be identified with the use of c-miRNAs. Here, we described the state of the art of liquid biopsy based on c-miRNAs as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy for BC. There has been a noticeable increase in the number of studies suggesting new miRNAs, with different combinations, as well as innovative technologies that can improve the accuracy of c-miRNAs as BC biomarkers. Although significant progress has been made, there is still no consensus on the use of specific c-miRNAs, or c-miRNAs panels, as BC biomarkers.

All these variations may be caused by different sources of c-miRNAs (cell-free, EVs), derived from whole blood, serum, or plasma, as well as by differences in the isolation methods, platforms used to analyze these miRNAs, and the statistical analysis. Nevertheless, through this review we have provided evidence that c-miRNAs indeed have potential to be used as biomarkers in several aspects of BC, such as biomarker, prognosis, and therapy. The translation to clinical setting can be achieved through standardization of the methodologies used to access c-miRNA levels. In conclusion, liquid biopsy shows huge potential and comes

to support current strategies incrementing diagnosis, prognosis, and follow-up, contributing to the development of personalized and precision medicine in BC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors have read the journal's authorship agreement and policy on disclosure of potential conflicts of interest. All authors have no conflicts of interest to declare. The manuscript has been reviewed by and approved by all authors. This study was partially funded by PRONEX, and PPSUS – Fundação Araucária-CNPq-MS (to EMSFR and DM). Scholarships to PMMO, TSJ, and TMC were provided by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)” - Finance Code 001.

REFERENCES

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018.
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24:2206–23.
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938–48.
- Buscail E, Maubail C, Muscarel F, Chiche L, Cordelier P, Dabernat S, et al. Liquid Biopsy Approach for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 2019;11.
- Feng W, Dean DC, Hornicek FJ, Shi H, Duan Z. Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer. *Mol Cancer* 2019;18:124.
- Khandelwal A, Seam RK, Gupta M, et al. Circulating microRNA-590-5p acts as a liquid biopsy marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2020;111:826–39.
- Moreno JG, Gomella LG. Evolution of the Liquid Biopsy in Metastatic Prostate Cancer. *Urology* 2019;132:1–9.
- Perez-Callejo D, Romero A, Provencio M, Torrente M. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. *Transl Lung Cancer Res* 2016;5:455–65.
- Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis* 2017;8:e3045.
- Wang H, Peng R, Wang J, Qin Z, Xue L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clin Epigenetics* 2018;10:59.
- Chan M, Liaw CS, Ji SM, et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res* 2013;19:4477–87.
- Ng EK, Li R, Shin VY, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One* 2013;8:e53141.
- Si H, Sun X, Chen Y, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:223–9.
- Elghoroury EA, ElDine HG, Kamel SA, et al. Evaluation of miRNA-21 and miRNA Let-7 as prognostic markers in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2018;18:e721–e6.
- Hagrass HA, Sharaf S, Pasha HF, Tantawy EA, Mohamed RH, Kassem R. Circulating microRNAs - a new horizon in molecular diagnosis of breast cancer. *Genes Cancer* 2015;6:281–7.
- Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, et al. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Mol Oncol* 2014;8:874–83.
- Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramirez JA, Malagon-Santiago I, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis Markers* 2013;34:163–9.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350–5.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92–105.
- Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, Visone R. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19:459.
- Mandujano-Tinoco EA, Garcia-Venzor A, Melendez-Zajgla J, Maldonado V. New emerging roles of microRNAs in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2018;171:247–59.
- Hannafon BN, Trigos YD, Calloway CL, et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2016;18:90.
- Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015;61:112–23.
- Papadaki C, Stratigos M, Markakis G, et al. Circulating microRNAs in the early prediction of disease recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2018;20:72.
- McAnena P, Tanriverdi K, Curran C, et al. Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal A from metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2019;19:436.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5003–8.
- Zeng Z, Chen X, Zhu D, Luo Z, Yang M. Low expression of circulating microRNA-34c is associated with poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Yonsei Med J* 2017;58:697–702.
- Shaker O, Maher M, Nassar Y, Morcos G, Gad Z. Role of microRNAs -29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene* 2015;560:77–82.
- Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R, et al. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection. *PLoS One* 2012;7:e29770.
- Sohel MH. Extracellular/circulating MicroRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Ach Life Sci* 2016;10:175–86.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423–33.
- Zealy RW, Wrenn SP, Davila S, Min KW, Yoon JH. microRNA-binding proteins: specificity and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2017;8:e1414.
- Tunak L, Misjak P, Szabo TG, et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics* 2011;74:2025–33.
- Belting M, Wittrup A. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 2008;183:1187–91.

35. Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 1984;35:256–63.
36. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999;94:3791–9.
37. Martinez-Fernandez M, Paramio JM, Duenas M. RNA detection in urine: from RNA extraction to good normalizer molecules. *J Mol Diagn* 2016;18:15–22.
38. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10:1470–6.
39. Ozawa PMM, Alkhilaiwi F, Cavalli IJ, Malheiros D, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Cavalli LR. Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. *Breast Cancer Res Treat* 2018;172:713–23.
40. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147:423–31.
41. Sinclair N, Littenberg B, Geller B, Muss H. Accuracy of screening mammography in older women. *AJR Am J Roentgenol* 2011;197:1268–73.
42. Checka CM, Chun JE, Schnabel FR, Lee J, Toth H. The relationship of mammographic density and age: implications for breast cancer screening. *AJR Am J Roentgenol* 2012;198:W292–5.
43. Britton P, Warwick J, Wallis MG, et al. Measuring the accuracy of diagnostic imaging in symptomatic breast patients: team and individual performance. *Br J Radiol* 2012;85:415–22.
44. Guadagni F, Ferroni P, Carlini S, et al. A re-evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) as a serum marker for breast cancer: a prospective longitudinal study. *Clin Cancer Res* 2001;7:2357–62.
45. Gonzalez RM, Daly DS, Tan R, Marks JR, Zangar RC. Plasma biomarker profiles differ depending on breast cancer subtype but RANTES is consistently increased. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:1543–51.
46. Bramwell VH, Tuck AB, Chapman JA, et al. Assessment of osteopontin in early breast cancer: correlative study in a randomised clinical trial. *Breast Cancer Res* 2014;16:R8.
47. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-I studies. *Breast Cancer Res* 2014;16:428.
48. Kazarian A, Blyuss O, Metodiev G, et al. Testing breast cancer serum biomarkers for early detection and prognosis in pre-diagnosis samples. *Br J Cancer* 2017;116:501–8.
49. Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol* 2010;119:586–93.
50. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genom* 2012;13:357.
51. Cha DJ, Franklin JL, Dou Y, et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *Elife* 2015;4:e07197.
52. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015;61:56–63.
53. Huang Q, Yang J, Zheng J, Hsueh C, Guo Y, Zhou L. Characterization of selective exosomal microRNA expression profile derived from laryngeal squamous cell carcinoma detected by next generation sequencing. *Oncol Rep* 2018;40:2584–94.
54. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 2010;5:e13515.
55. Zhu J, Zheng Z, Wang J, et al. Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Front Genet* 2014;5:149.
56. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010;251:499–505.
57. Sochor M, Basova P, Pesta M, et al. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer* 2014;14:448.
58. Li M, Zhou Y, Xia T, et al. Circulating microRNAs from the miR-106a-363 cluster on chromosome X as novel diagnostic biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2018;170:257–70.
59. Kumar S, Keerthana R, Pazhanimuthu A, Perumal P. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian J Biochem Biophys* 2013;50:210–4.
60. Gao J, Zhang Q, Xu J, Guo L, Li X. Clinical significance of serum miR-21 in breast cancer compared with CA153 and CEA. *Chin J Cancer Res* 2013;25:743–8.
61. Li S, Yang X, Yang J, Zhen J, Zhang D. Serum microRNA-21 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med* 2016;16:29–35.
62. Eicheler C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem* 2013;59:1489–96.
63. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R90.
64. Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One* 2012;7:e47003.
65. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist* 2010;15:673–82.
66. Cuk K, Zucknick M, Heil J, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer* 2013;132:1602–12.
67. Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 2010;5:e13735.
68. Zearo S, Kim E, Zhu Y, et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer* 2014;14:200.
69. Jurkovicova D, Smolkova B, Magyerkova M, et al. Down-regulation of traditional oncomiRs in plasma of breast cancer patients. *Oncotarget* 2017;8:77369–84.
70. Zeng RC, Zhang W, Yan XQ, et al. Down-regulation of miRNA-30a in human plasma is a novel marker for breast cancer. *Med Oncol* 2013;30:477.
71. Ferracin M, Lupini L, Salamon I, et al. Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. *Oncotarget* 2015;6:14545–55.

72. van Schooneveld E, Wouters MC, 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 Res* 2012;14:R34.
73. Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J, et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci* 2016;107:326–34.
74. Cui X, Li Z, Zhao Y, et al. Breast cancer identification via modeling of peripherally circulating miRNAs. *PeerJ* 2018;6:e4551.
75. Ozawa PMM, Vieira E, Lemos DS, et al. Identification of miRNAs Enriched in Extracellular Vesicles Derived from Serum Samples of Breast Cancer Patients. *Biomolecules* 2020;10:150.
76. Hu Z, Dong J, Wang LE, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis* 2012;33:828–34.
77. Shen J, Hu Q, Schrauder M, et al. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. *Oncotarget* 2014;5:5284–94.
78. Freres P, Wenric S, Boukerroucha M, et al. Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer. *Oncotarget* 2015;7:5416–28.
79. Zhang L, Xu Y, Jin X, et al. A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;154:423–34.
80. Farina NH, Ramsey JE, Cuke ME, et al. Development of a predictive miRNA signature for breast cancer risk among high-risk women. *Oncotarget* 2017;8:112170–83.
81. Lasham A, Fitzgerald SJ, Knowlton N, et al. A predictor of early disease recurrence in breast cancer patients using a cell-free RNA and protein liquid biopsy. *Clin Breast Cancer* 2019;19:30645–7.
82. Zou X, Li M, Huang Z, et al. Circulating miR-532-502 cluster derived from chromosome X as biomarkers for diagnosis of breast cancer. *Gene* 2019;144104.
83. Grimaldi AM, Incoronato M. Clinical Translatability of “Identified” Circulating miRNAs for Diagnosing Breast Cancer: Overview and Update. *Cancers (Basel)* 2019;11.
84. Sueta A, Yamamoto Y, Tomiguchi M, Takeshita T, Yamamoto-Ibusuki M, Iwase H. Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence. *Oncotarget* 2017;8:69934–44.
85. Huo D, Clayton WM, Yoshimatsu TF, Chen J, Olopade OI. Identification of a circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. *Oncotarget* 2016;7:55231–48.
86. Baroni S, Romero-Cordoba S, Plantamura I, et al. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis* 2016;7:e2312.
87. Le MT, Hamar P, Guo C, et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J Clin Invest* 2014;124:5109–28.
88. Li Y, Liang Y, Sang Y, et al. MiR-770 suppresses the chemoresistance and metastasis of triple negative breast cancer via direct targeting of STMN1. *Cell Death Dis* 2018;9:14.
89. Zhang G, Zhang W, Li B, et al. MicroRNA-200c and microRNA-141 are regulated by a FOXP3-KAT2B axis and associated with tumor metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2017;19:73.
90. Wu X, Somlo G, Yu Y, et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med* 2012;10:42.
91. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 2009;7:4–13.
92. Kk Sahlberg, G Bottai, Naume B, et al. A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2015;21:1207–14.
93. Liu Y, Zhang Y, Li Q, et al. MiRNAs predict the prognosis of patients with triple negative breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0170088.
94. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 2012;23(Suppl 6):vi7–12.
95. Madhavan D, Peng C, Wallwiener M, et al. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis* 2016;37:461–70.
96. Jung EJ, Santarpia L, Kim J, et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer* 2012;118:2603–14.
97. Muller V, Gade S, Steinbach B, et al. Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147:61–8.
98. Gezer U, Keskin S, Igci A, et al. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Lett* 2014;8:845–8.
99. Alamolhodaei NS, Behravan J, Mosaffa F, Karimi G. MiR 221/222 as new players in tamoxifen resistance. *Curr Pharm Des* 2016;22:6946–55.
100. Rigaud VO, Ferreira LR, Ayub-Ferreira SM, et al. Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncotarget* 2017;8:6994–7002.
101. Chen WX, Cai YQ, Lv MM, et al. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumour Biol* 2014;35:9649–59.
102. Chen WX, Liu XM, Lv MM, et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* 2014;9:e95240.
103. Zhong S, Chen X, Wang D, et al. MicroRNA expression profiles of drug-resistance breast cancer cells and their exosomes. *Oncotarget* 2016;7:19601–9.
104. Zhong S, Li W, Chen Z, Xu J, Zhao J. MiR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells. *Gene* 2013;531:8–14.
105. Shivapurkar N, Vietsch EE, Carney E, Isaacs C, Wellstein A. Circulating microRNAs in patients with hormone receptor-positive, metastatic breast cancer treated with dovitinib. *Clin Transl Med* 2017;6:37.
106. Shen H, Wang D, Li L, et al. MiR-222 promotes drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin via modulation of PTEN/Akt/FOXO1 pathway. *Gene* 2017;596:110–8.
107. Yu DD, Wu Y, Zhang XH, et al. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222. *Tumour Biol* 2016;37:3227–35.
108. Gu X, Xue JQ, Han SJ, Qian SY, Zhang WH. Circulating microRNA-451 as a predictor of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Biomark* 2016;16:395–403.
109. Li Q, Liu M, Ma F, et al. Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal A subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel. *PLoS One* 2014;9:e104870.
110. Singh R, Pochampally R, Watabe K, Lu Z, Mo YY. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014;13:256.
111. Lee JK, Park SR, Jung BK, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One* 2013;8:e84256.

112. Donnarumma E, Fiore D, Nappa M, et al. Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:19592–608.
113. Rodriguez-Martinez A, de Miguel-Perez D, Ortega FG, et al. Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2019;21:21.
114. Gao S, Wang Y, Wang M, et al. MicroRNA-155, induced by FOXP3 through transcriptional repression of BRCA1, is associated with tumor initiation in human breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:41451–64.
115. Bovy N, Blomme B, Freres P, et al. Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget* 2015;6:10253–66.
116. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH, Yu Q. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;44:1741–8.
117. Mao L, Li J, Chen WX, et al. Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. *Tumour Biol* 2016;37:5247–56.
118. O'Brien K, Lowry MC, Corcoran C, et al. miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity. *Oncotarget* 2015;6:32774–89.
119. Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z, Zhong XY. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biol* 2013;34:455–62.
120. Khodadadi-Jamayran A, Akgol-Oksuz B, Afanasyeva Y, et al. Prognostic role of elevated mir-24-3p in breast cancer and its association with the metastatic process. *Oncotarget* 2018;9:12868–78.
121. Eichelscher C, Stuckrath I, Muller V, et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget* 2014;5:9650–63.
122. Zheng R, Pan L, Gao J, et al. Prognostic value of miR-106b expression in breast cancer patients. *J Surg Res* 2015;195:158–65.
123. Antofin S, Calvo L, Blanco-Calvo M, et al. Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer. *BMC Cancer* 2015;15:297.
124. Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009;2:89.
125. Chen J, Shin VY, Siu MT, Ho JC, Cheuk I, Kwong A. miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2016;16:887.
126. Joosse SA, Muller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* 2014;111:909–17.
127. Swellam M, Mahmoud MS, Hashim M, Hassan NM, Sobeh ME, Nageeb AM. Clinical aspects of circulating miRNA-335 in breast cancer patients: a prospective study. *J Cell Biochem* 2019;120:8975–82.
128. Satomi-Tsushita N, Shimomura A, Matsuzaki J, et al. Serum microRNA-based prediction of responsiveness to eribulin in metastatic breast cancer. *PLoS One* 2019;14:e022024.
129. Shin VY, Siu JM, Cheuk I, Ng EK, Kwong A. Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. *Br J Cancer* 2015;112:1751–9.
130. Wang H, Tan G, Dong L, et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One* 2012;7:e34210.
131. Zhao R, Wu J, Jia W, et al. Plasma miR-221 as a predictive biomarker for chemoresistance in breast cancer patients who previously received neoadjuvant chemotherapy. *Onkologie* 2011;34:675–80.
132. Matamala N, Vargas MT, Gonzalez-Campora R, et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clin Chem* 2015;61:1098–106.
133. Ono S, Lam S, Nagahara M, Hoon DS. Circulating microRNA biomarkers as liquid biopsy for cancer patients: pros and cons of current assays. *J Clin Med* 2015;4:1890–907.
134. O'Brien KP, Ramphul E, Howard L, et al. Circulating microRNAs in cancer. In: Rani S, ed. *MicroRNA profiling. Methods in molecular biology*, 1509. New York, NY: Humana Press; 2017.
135. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* 2011;6:e20769.
136. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7:1535750.
137. Hrustincova A, Votavova H, Dostalova Merkerova M. Circulating microRNAs: methodological aspects in detection of these biomarkers. *Folia Biol (Praha)* 2015;61:203–18.
138. Lee I, Baxter D, Lee MY, Scherler K, Wang K. The importance of standardization on analyzing circulating RNA. *Mol Diagn Ther* 2017;21:259–68.
139. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 2014;18:371–90.
140. Poel D, Buffart TE, Oosterling-Jansen J, Verheul HM, Voortman J. Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Exp Mol Med* 2018;50:e454.

APÊNDICE 2 – Artigo: *What is the role of miR-146a in breast cancer? An integrative review*

****** Esse artigo ainda será submetido

What is the role of miR-146a in breast cancer? An integrative review

Tayana Schultz Jucoski¹, Talita Helen Bombardelli Gomig², Tamyres Mingorance Carvalho¹, Danielle Malheiros¹, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹

1 - Laboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Postgraduate Program in Genetics. Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil.

2 – Biobank of Little Prince Hospital, Brazil.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a relevant public health issue worldwide and represents the most common cancer among women, with high mortality rate ranks. Early detection is crucial to improve the BC diagnosis, prognosis, and therapeutics. In cancer research, efforts to identify molecular markers related to pathological conditions have been widely applied, and several candidate molecules are being described in tumorigenesis, such as microRNAs (miRNAs). These small non-coding RNAs act as endogenous regulators of multiple genes, including known cancer drivers, and potentially influence breast tumorigenesis. The miR-146 family was described in BC initiation, progression, and metastasis, and their members (miR-146a/b) were associated with many hallmarks of cancer. Notably, miR-146a has been described as a potential biomarker of breast tumorigenesis acting in the inflammatory process and participating in metastasis steps. This review gathers the central pathways that can be influenced by miR-146a dysregulation and their importance in breast cancer development and progression.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer worldwide, with approximately 2.3 million new cases, representing 11.7% of all cancer cases estimated for 2020 and the leading cause of cancer death among women globally (Sung *et al.*, 2021). Efforts to promote early detection as clinical and image screening programs are essential to improving survival and reducing morbidity and treatment costs (Shulman *et al.* 2010, WHO, 2017). In addition, molecular markers can be useful to complement existing diagnostic methods and technologies. In this context, the miRNAs (miRNAs) show attractive potential as diagnostic and therapeutic targets since they are regulators of many biological processes.

MiRNAs are a class of small (usually 18-25 nucleotides) single-stranded and non-coding RNA. These molecules are physiological regulators of gene expression at the post-transcriptional level by binding to 3'UTR of their target mRNAs, inhibiting the

translation or degrading the mRNA. MiRNAs play crucial role in biological and pathological processes, including cell signaling pathways, cell cycle, differentiation, proliferation, cell death, metabolism, and tumorigenesis. The dysregulated expression of these molecules has been implicated in carcinogenesis, metastasis, and response to therapy (Elsarraj et al., 2012; Li et al., 2015a). Abnormal miRNA expression was also associated with the BC molecular subtypes (Blenkiron et al., 2007; Cheng et al., 2009).

Notably, the miR-146 family has exciting potential as a diagnostic and therapeutic target in cancer. Most of the miR-146 literature focuses on its function in inflammation and innate immune response, whose dysregulation has been described in oncogenesis (Paterson and Kriegel, 2017). The human miR-146 family was first described by Taganov et al. in 2006 (Taganov et al., 2006) and consists of two members, miR-146a-5p and miR-146b-5p. Both miRNAs have nearly identical sequences, share a seed region, and target the same set of genes besides their different regulation in many cases (Paterson and Kriegel, 2017). The miR-146a primary transcript (pri-miR) is transcribed from *MIR146A* gene, located in chromosome 5 (5q33.3) within a long non-coding RNA host gene (*MIR3142HG*), while miR-146b is transcribed from *MIR146B* founded in an intergenic region of chromosome 10 (10q24.32) (Paterson and Kriegel, 2017).

The first clear functional connection of miR-146 family and cancer pathology linked these regulators to signaling in metastatic breast cancer cells (Bhaumik et al., 2008). Recently, they are described in cancer development, including BC. Specifically, miR146a was reported in BC initiation, progression, and metastasis (Melo and Esteller, 2011), with differential expression between primary breast tumors and non-tumor breast tissues and plasma levels. Besides, miR-146a could discriminate the patients from healthy individuals (Markou et al., 2016) and presents different expression levels in distinct BC subtypes (M'hamed et al., 2015; Bai et al., 2019). In addition, miR-146a has been associated with several cancer-related molecules, such as NF- κ B, IRAK1, RhoA, and CXCR4 (Elsarraj et al., 2012; Liu et al., 2016). These findings indicate that miR-146a plays a critical role in BC development and progression and points to this regulator as a potential biomarker of breast tumorigenesis.

In this review, the ambiguous role of miR-146a was explored in breast cancer, aiming to clarify its influence in this disease based on expression/functional analyses. Our investigation highlights dual role of this miR in breast tumorigenesis acting as oncogenic or suppressor depending on the context.

METHODS

Literature search strategy

An integrative review of miR-146a in breast cancer literature was conducted. To this end, we performed search articles published until August 2021 in three electronic databases: PubMed (PM) (National Library of Medicine), Science Direct (SD) (Elsevier), and Web of Science (WS) (Clarivate Analytics). Search terms “microRNA-

146a", "miRNA-146a", and "breast cancer" were used with Boolean operators ("and" / "or") to obtain the first articles list. Two authors realize this step and the subsequent selection independently, and a third author-verified both lists in two points of the selection process (FIGURE 1).

Selection articles strategy

One list of each database was created. After the removal of duplicate articles, two independent lists are generated - one of each author. At this moment, reviews, systematic reviews, meta-analyses, commentaries, and book chapters were excluded (FIGURE 1). The eligibility criteria applied to quantitative or qualitative original research studies and studies written in English.

Following, both titles and abstracts were evaluated to decide whether a study could be included/excluded in the review. Articles were eligible if they fulfilled the following terms "microRNA-146a/miR-146a" and "breast cancer" and focused on analyzing this molecule. Here, the third author merges both independent lists, excluding duplicate articles and producing the only list with articles (FIGURE 1). Finally, the final list was evaluated according to some parameters such journal impact factor (values between 2 and 5), sample type (tissue, serum/plasma, cell line, animal), and technical approach (type of methodology, for example, RT-qPCR, microarray, sequencing). Thereby 100 articles were selected and used to perform this review.

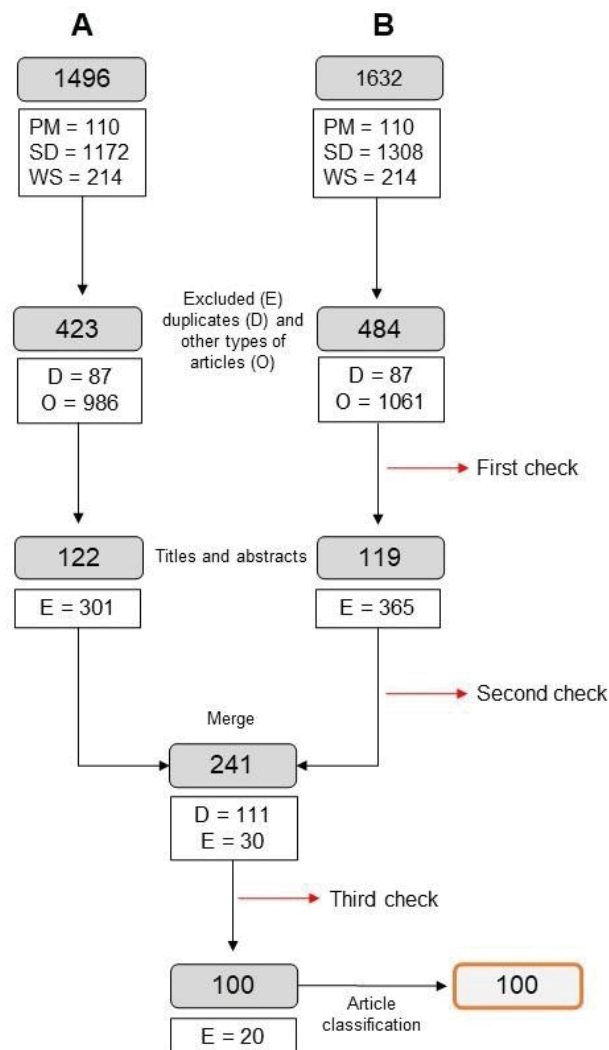


FIGURE 1. Scheme of literature search and article selection strategies. Two independently authors (A and B) performed a literature search in three databases (PubMed (PM), Science Direct (SD), and Web of Science (WS)) using specific terms (“microRNA-146a or miR-146a” and “breast cancer”), and a subsequent article selection analyzing title and abstract. Just original articles in English that comprised information about miR-146a role in breast cancer were maintained. A third author-verified both lists in three process points and merged both A and B author lists. Here, duplicated (D) and other types of articles (O) were excluded (E), resulting in an only list. The articles in the final list were evaluated according to some parameters, and in the end, 100 articles were included in this integrative review.

RESULTS AND DISCUSSION

1. *miR-146a and hallmarks of cancer*

Cancer development involves several molecules, pathways, and alterations in the genome that Hanahan and Weinberg collected in ten capabilities exhibited by tumors, the hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2000; 2011). These competencies comprise: sustaining proliferative signaling; evading growth suppressors; activating invasion and metastasis process; enabling replicative immortality; inducing angiogenesis; evading cell death by apoptosis; cellular deregulation metabolism; genome instability and mutation; avoiding immune system; and tumor-promoting inflammation.

Among the biomolecules, miRNAs play a crucial role in hallmarks because they act as gene expression regulators. This topic will discuss miR-146a and its targets portrayal in some tumor characteristics focusing on breast cancer.

1.1 *Regulating tumor suppressor and proliferative signaling: BRCA and EGFR*

BRCA proteins (BRCA1 and BRCA2) are essential to maintaining cellular integrity once they play a role in diverse critical pathways such as proliferation and DNA repair. Accordingly, due to the tumor-suppressive role of BRCA, any perturbation in this regulation can contribute to BRCA-mediated tumor development (Chang, 2012). The involvement of miR-146a and miR-146b in BRCA1 regulation arises since these molecules bind to the same site in the 3'UTR of mRNA BRCA1 and promote a downregulation (Garcia, 2011). The *in silico* approach listed miRNAs predicted to bind in this 3'UTR at 38 different regions, including the miR-146a/b. Consequently, this interaction can reduce BRCA1 levels, increase proliferation, and reduce the homologous recombination rate, two processes controlled by BRCA1, showing an oncogenic activity of miR-146a/b (Garcia, 2011).

A higher level of miR-146a-5p is observed in BC tissue, especially in the TNBC subtype, compared with non-tumor tissue (Garcia, 2011; M'hamed, 2015; Gao, 2018). It is reported that TNBC tumors have a downregulation of BRCA1 compared with other BC subtypes, being the tumors arising in carriers of *BRCA1* mutations. (Turner, 2006; 2007). In sporadic TNBC, BRCA1 is frequently inactivated at the transcriptional level, and it has been reported that this inactivation may be due promoter methylation (M'hamed, 2015). High levels of miR-146a were observed in TNBC, ER-/PR-, and in tumors with grade III (Garcia, 2011). In concordance with, TCGA analysis for miR-146a-5p shows increased expression of this miRNA in TNBC (M'hamed, 2015). In addition, miR-146a expression with regular BRCA1 expression leads to a shorter overall survival at 5 years (Zavala, 2016). In cell lines evaluation, miR-146a expression was reduced or absent in normal cell lines compared to BC cell lines. Besides, basal-like cell lines along with low BRCA1 expression shows higher levels of miR-146a (Garcia, 2011). Nonetheless, low expression of miR-146a can predict positive lymph

node status and is associated with poor patients' overall survival (OS) (Kumaraswamy, 2014).

A significant association between EGFR expression and BRCA1 alterations has been reported (Bhaumik, 2008; Kumaraswamy, 2014; M'hamed, 2015; Tao, 2015; Zavala, 2016). This relation is based on the tumor suppressor activity of BRCA1 that acts in multiple cellular processes and to play these roles, BRCA1 interacts with many proteins; one of them is EGFR (Huen, 2010; Gorski, 2010; Silver, 2012).

EGFR is a member of the HER family of transmembrane receptor tyrosine kinases and is essential for proliferation and differentiation. Its altered expression is observed in different types of cancer, contributing to invasion, metastasis, and angiogenesis (Schlessinger, 2000; Yarden, 2001; Huang, 2014; Du, 2013; Mu, 2014). Therefore, alteration in EGFR expression was correlated with tumor progression, chemotherapy resistance, and poor prognosis (Sainsbury, 1987; Rimawi, 2010). For example, a low EGFR level is mainly associated with good prognosis, better relapse-free survival (RFS), and overall survival from BC (Sainsbury, 1987; Nicholson, 2001; Viale, 2009). Both miR-146 show to regulate EGFR in different cell types (Li, 2010; Xu, 2011). It is suggested that miR-146a might mediate post-transcriptional regulation of EGFR by BRCA1 (FIGURE 2). The miR-146a overexpression promotes proliferation through reduced BRCA1, and EGFR shows an oncogenic role. In the BC cell line with reduced BRCA1-expression was observed high miR-146a level than BRCA1- normal cell lines (Tao, 2015; Gao, 2018). Hence, it is hypothesized that BRCA1 might downregulate the *EGFR* expression increasing the miR-146a level in BC-derived cells (HCC1937 and SUM1315) (Kumaraswamy, 2014; M'hamed, 2015).

Kumaraswamy (2014) describes a negative correlation between BRCA1 and EGFR and an inverse relation with miR-146a, suggesting that BRCA1 binds in *MIR146A* promoter and activates its expression attenuating EGFR expression by physical interaction of miR-146a with 3'UTR of EGFR mRNA. In this study, thirteen cell lines were evaluated, and a positive correlation between BRCA1 and miR-146a expression was founded in the TNBC cell line. Consequently, this miRNA can be acting downstream of BRCA1 and mediating the EGFR regulation in tumor cells directly. Based on this via, BC cell lines with BRCA1 low or null expression exhibit reduced levels of miR-146a, leading to EGFR overexpression compared to BC cell line with BRCA1 normal levels (moderate or high). An evaluation of BRCA1-EGFR breast tumors shows that 52% of BRCA1-altered tumors are also EGFR-positive, and 83% of samples with EGFR overexpression didn't show miR-146a upregulation (Kumaraswamy, 2014; Zavala, 2016). The EGFR overexpression is a common characteristic in TNBC and is associated with altered BRCA1 expression (Toyama et al., 2008; Collins et al., 2009; Rakha et al., 2009). Therefore, it is proposed that in TNBC, EGFR expression can be a consequence of miR-146a reduction rather than only the absence of the BRCA1. Therefore, miR-146a can regulate BRCA1 and EGFR in different mechanisms in TNBC. Besides, 26% of tumors displayed miR-146a upregulation, abnormal BRCA1-expression, and negative EGFR; this scenario indicates that this miRNA could regulate both mRNAs (Kumaraswamy, 2014; Zavala, 2016). These outcomes, taken together, suggest a complex feedback regulation between miR-146a, BRCA1, and EGFR.

1.2 Evading apoptosis and tumor-promoting inflammation: NF- κ B - IRAK1 – TRAFs

MiR-146a has been demonstrated to negatively regulate NF- κ B activity by downregulating IRAK1 and TRAF6 (Bhaumik et al., 2008). Furthermore, EGFR-mediated activation of NF- κ B has been proposed to be important in the proliferation and survival of EGFR overexpressing tumor cells (Shostak and Chariot, 2015).

The nuclear factor- κ B (NF- κ B) is an important transcription factor that promotes the expression of several genes involved in inflammatory and antiapoptotic response being the main target of miR-146a (FIGURE 2). In BC, alterations in NF- κ B pathway contribute to tumor progression, which can be mediated by miRNAs. MiR-146a, as well as miR-19 and miR-205, can reduce NF- κ B pathway activity (Tanic, 2011). Additionally, miR-146a targets also TRAF6 and IRAK1, two NF- κ B activators.

The IRAK1 (Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1) is the serine/threonine kinase associated with the IL1R (Interleukin 1 Receptor) which enables the activation of the NF- κ B pathway. Besides that, IRAK1 is also a downstream factor in the Toll-Like Receptor signaling, another way to activate the NF- κ B, and its expression is higher in several types of cancers, including lung, breast, hepatocellular carcinoma, and endometrial carcinoma (Zhang, 2014; Wee, 2015; Ye, 2017; Wang, 2018). This abnormal expression is associated with metastasis, cell growth, and development to treatment resistance, for example, paclitaxel resistance in BC (Wee, 2015). Long and colleagues (2019) observed downregulation of miR-146a-5p in BC tissues compared to adjacent normal tissue. Their overexpression suppressed proliferation, invasion, and migration in MCF-7 and MDA-MB-453 (Long, 2019). This scenario suggests a reduction of the IRAK1 expression by direct interaction with miR-146a.

A reduction of invasiveness was observed in the MDA-MB-231 cell line due to miR-146a/b-targeted suppression of the IRAK1 and TRAF6 affecting the metastatic potential (Bhaumik, 2008). Besides the TRAF6, others TNF receptor-associated factor (TRAF) protein family members are predicted to be the miR-146a targets, for example, TRAF1 and TRAF2 (Taganov et al., 2006; Tanic, 2011). These molecules are involved in regulating the inflammation process and the apoptosis acting as the mediator of TNF, NF- κ B, and MAPK pathways, even as IRAK 1. High levels of miR-146a lead to reduction of TRAF6 protein (Bhaumik, 2008). Functional analysis *in vitro* and *in vivo* revealed that miR-146a represses NF- κ B through a negative feedback loop involving the downregulation of IRAK1 and TRAF6 (Taganov, 2006; Bhaumik, 2008).

As discussed here, cancer cells increase the activity of the NF- κ B pathway that contributes to proliferation, invasion, migration, angiogenesis, and survival potentials by mechanisms involving miR-146a. The role of miR-146a in this scenario is to regulate the NF- κ B pathway negatively via IRAK1 and TRAF6 down expression. Therefore, a miR-146a super expression has protective action that reduces IRAK1 and TRAF6 expression and, consequently, reduces the activation of the NF- κ B pathway. However,

studies also demonstrate the miR-146a expression and suppression of NF- κ B activity in metastatic BC cell lines (Bhaumik, 2008).

In the treatment area, Paclitaxel can reduce the viability of BC cells in a dose-dependent manner. Li *et al.* (2020) related that miR-146a could enhance the sensitivity of MCF-7 cells to Paclitaxel by IRAK1 downregulation mechanism. Those results showed a miR-146a positive role in the BC treatment that can be more explored.

1.3 Activating invasion and metastasis process: BRMS1, RhoA, WWOX and CXCR4

Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) regulates gene expression related to metastasis leading to its suppression in breast and ovarian xenograft and synergic models (Zhang, 2006; Bodenshtein, 2008; Hurst *et al.*, 2008; Phadke *et al.*, 2008; Stafford, 2008). Some studies demonstrate an inverse correlation between BRMS1 expression and metastasis, development, and survival (Hicks, 2006; Lombardi, 2006). Therefore, BRMS1 can act as a metastasis suppressor agent in the transcriptome, post-transcriptome, and proteome regulation (Edmonds, 2009).

The strategy proposed to BRMS1 is altering SIN3/histone deacetylase (HDAC) chromatin remodeling complexes, allowing the interaction with transcription factors directly in DNA and modulating gene expression, interfering in several hallmarks of cancer, such as apoptosis, invasion, migration, and adhesion (Kodura, 2015; Welch, 2016). Some genes regulated by this system are, for example, OPN (osteopontin), connexins, and EGFR (Hedley, 2008; Vaidya, 2008). Besides, BRMS1 also integrates a negative regulation mechanism of NF- κ B through interaction with RelA/p65 and inhibition of I κ B α phosphorylation (Cicek *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Edmonds *et al.* (2009) compared the 328 miRNAs expression between BRMS1-expressing and non-expressing BC cells. They reported that BRMS1 can downregulate three metastasis-promoter miRNAs (miR-10b, miR-373, and miR-520c) and upregulate three metastasis-suppressing miRNAs (miR-146a/b and miR-335), as well as studied by Hashemi (2019). The miR-146a/b seems to act as a downstream mediator of BRMS1 metastasis activity in the tumor.

Thereby, the BRMS1 metastasis suppressor activity can be regulated at different levels by miRNAs, contributing to the metastatic process in cancer cells (Hurst, 2009a). For example, the miR-146a/b demonstrate high expression in the BRMS1-expressing cells acting as anti-metastatic (Edmonds, 2015; Hashemi, 2019). Furthermore, it is known that miR-146a/b acts as a suppressor in the invasion-migration cascade. The fact that miR-146a/b participates in EGFR expression and NF- κ B pathway regulation indicates that they play a role in tumor metastasis by reducing EGFR that inhibited invasion and migration *in vitro* and *in vivo* models (Hurst, 2009a; Edmonds, 2015; Hashemi, 2019).

A member of the Rho GTPase family - RhoA plays an essential role in the signal transduction and cytoskeleton reorganization, participating in various processes, such as cell motility, cell polarity, and adhesion. Previous studies demonstrate that several tumors exhibit a RhoA altered expression contributing to invasion and metastasis. Liu

and colleagues (2016) related an inverse correlation between miR-146a and RhoA expression. In the MDA-MB-231 cell line transfected with miR-146a, the RhoA protein levels were reduced even as their metastatic potential. Therefore, downregulation of miR-146a increased the migration of BC cells due to the upregulation of RhoA expression indicates a metastatic suppressing activity of miR-146a (FIGURE 2).

A recent study with triptolide, an extract of *Tripterygium wilfordii* that has anticancer activity, observed inhibition of proliferation and invasion, and increased apoptosis in the TNBC cell line (Liu, 2019). The invasion process involves miR-146a that are upregulated by triptolide, and target Rac1, a member of the Rho GTPase family. The authors propose an approach with triptolide and miR-146a to improve the effectiveness of this compound in breast cancer treatment. RhoA and Rac1 are overexpressed in some types of cancer, as breast cancer. They play an essential role in tumor invasion and metastasis through cytoskeleton reorganization by regulating key proteins.

The WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) is an active common fragile site in cancer, FRA16D. It acts as a tumor suppressor with anti-metastatic activities involving the regulation of several key miRNAs and the reduced or absent WWOX protein expression has been reported in several cancer types. More than half of cases in BC exhibit altered expression of WWOX being more frequent in TNBC and associated with metastasis and unfavorable outcome. In this context, WWOX inactivation is correlated with advanced stages of TNBC, and its reduced levels promote metastasis. Besides that, WWOX acts as a negative regulator of MYC, which regulates miR-146a expression, and consequently, fibronectin (FN1) levels contributing to the cell's epithelial status (FIGURE 2). Additionally, overexpression of the MYC in WWOX-expressing TNBC cells reduces WWOX effects on miR-146a and fibronectin levels (Khawaled, 2019).

Moreover, WWOX, through the regulation of miR-146a levels, regulates SMAD3, which is a member of the TGF- β signaling pathway (Khawaled, 2020), related to differentiation, migration, apoptosis, and extracellular matrix deposition. TGF- β -induced growth inhibition is mediated through SMAD-dependent inhibition of the expression of the MYC oncogene, cyclin-dependent kinases (CDKs), and CDC25A.

The C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) is an alpha-chemokine receptor specific for SDF-1 (stromal-derived factor-1 or CXCL12) and is the most common chemokine receptor expressed on tumor cells (Zheng, 2015). The SDF-1/CXCR4 axis is vital in the trafficking and homing of hematopoietic progenitors and can be involved in breast cancer-promoting proliferation, migration, invasion, and survival (Alsayed et al., 2007; Cojoc et al., 2013; Sun et al., 2014; Aravindan et al., 2015). CXCR4 mRNA expression was found aberrant in BC samples, higher in invasive ductal and lobular carcinomas tissues than normal breast tissue (Al-Souhibani et al., 2014). The organotropism of metastasis can be mediated by differential expression of chemokine receptors and ligands on tumor cells and tissues. BC cells commonly express high levels of CXCR4 and frequently colonize regions that express abundant SDF-1 (lung and bone, for example), a CXCR4 ligand. This dynamic can alter the metastatic tumor potential (Busillo, 2007; Kim, 2008).

CXCR4 is a direct target of miR-146a as well as other pro-metastatic genes like TRAF6, EGFR, and IRAK1 (Labbaye et al., 2008; Wang et al., 2013; Bhaumik et al., 2008; Hurst et al., 2009b; Li et al., 2010; Hung et al., 2013; Ali et al., 2014; Jiang et al., 2014) (FIGURE 2). Analysis *in vitro* demonstrates that the overexpression of CXCR4 inhibited the miR-146a activity, increasing TRAF6 and EGFR levels promoting proliferation, invasion, migration, and reducing apoptosis by activating the NF- κ B pathway (Zheng, 2015). On the other hand, miR-146a expression was decreased in MCF-7 compared to non-tumorigenic breast cell lines (HBL100), subsequently increasing the levels of its target.

Besides, CXCR4 3'UTR promoted proliferation, metastasis, and survival to inhibit apoptosis and regulate metastasis due to interaction with VIM, integrin, and E-cadherin by miR-146a dependent way (Zheng, 2015). The pro-metastasis role of CXCR4 leads to an NF- κ B pathway activation and increase of IL-6, IL-8, and VEGF simultaneously that TRAF6 and EGFR expression act through inhibition of the miR-146a. It is reported that miR-146a targets, IRAK1 and CXCR4, were upregulated in the HER2-positive BC. Results show that higher miR-146a decreased the protein levels of both. However, the CXCR4 mRNA was not affected by miR-146a, following the previous finding that miR-146a inhibits this target gene mainly through translational repression (Li, 2019).

1.4 Tumor microenvironment: Interleukins and MMPs

The tumor microenvironment (TME) comprises a diversity of nonmalignant cells that play essential roles in tumor progression and metastasis. Tumor-associated macrophages (TAMs) are present in TME, and some miRNAs collaborate with their participation in the tumor. MiR-146a and miR-222 were described as decreased in TAMs of BC and associated with the upregulated NF- κ B p50 subunit (Li, 2015b). Besides that, several cytokines are present (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) in the tumor microenvironment and can influence the negative regulation of miR-146a in late BC TAMs. *In vivo* data indicated that miRNAs, such as miR-146a/b, can influence breast tumor growth by promoting the M2 polarization or regulating the recruitment of BC TAMs (Li, 2015b).

Li and coauthors (2015a) evaluated miR-146a/b and IL-6 expression in tissue of BC from young women (≤ 35 years old) that exhibit more aggressive and associated with poor prognosis and fibroadenoma. The author related a lower level of mi-146a/b and a higher IL-6 level in BC compared with fibroadenoma and adjacent cancer tissues. Besides, some associations with clinical characteristics were shown, such as negative status of ER/PR/HER2, tumor size > 2 cm, Ki-67 index $\geq 20\%$, positive distant/lymph node metastasis, advanced stages III-IV and, basal-like molecular phenotype. Some miR-146a targets previously mentioned here lead to suppressing either NF- κ B-dependent tumor growth or expression of NF- κ B target genes such as interleukins (IL-1 β , IL-6, and IL-8). These results suggest that altered levels of miR-146a/b act as tumor suppressor molecules, and together with IL-6, a proinflammatory cytokine, can contribute to BC development in young women.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc (Zn²⁺) dependent endopeptidases present in the cytoplasm and membrane. They collaborate with the deterioration of extracellular matrix proteins (ECM); for example, collagen, laminin, and fibronectin helping in the ECM remodeling in physiological and pathological processes (Modal, 2020; Yi, 2020). MMPs also contribute to angiogenesis, lymphomagenesis vessels, infiltrate endothelial cells of the basement membrane, being crucial to secondary tumors establishment.

It was reported that expression levels of CXCR4 and MMP9, two important metastasis promoters, were reduced by FOXP3 in MCF-7 cells that induce miR-146a. Catalpol, a substance of *Rehmannia* with antitumoral potential and antiproliferative effects in breast cancer cells, was investigated in BC cells. The authors observed proliferation suppression and increase of apoptosis via reduction of MMP-16 that miR-146a regulates in MCF-7 cells treated with catalpol (Li, 2015c). MMP-16 acts as an enhancer of the invasion in BC cells, so the upregulation of miR-146a promotes its downregulation reducing the invasion capability (FIGURE 2).

2. Chromatin remodeling and HER2 interaction

Acetylation and deacetylation in *miR146a* can affect the miR expression and collaborate with the dysregulation of some targets in the tumor cells. For example, histone H3K56 acetylation and deacetylation on the *MIR146A* promoter occur by the histone deacetylase 1 (HDAC1) and acetyltransferase p300, both assembly by the transcription factor specificity protein 1 (Sp1). However, human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2 or HER2) signaling triggers the phosphorylation of Sp1, promoting its association with HDAC1, leading to histone hypoacetylation and consequent *MIR146A* silencing (Li, 2019). As a result, HDACi acts synergistically with HER2 targeting to upregulate Sp1 and suppress BC.

A high frequency of HER2 overexpression is observed in BC (20–30%), classifying it as a crucial driver and therapeutic target in BC. HER2-positive BC shows notable changes in the epigenome, such as histone modifications, as already presented. This scenario offers a possible alternative to HER2-BC treatment using HDAC inhibitor (HDACi), such as the trichostatin (TSA). A recent study showed that TSA could suppress HER2-overexpressing via upregulation of miR-146a, reducing its targets (IRAK1 and CXCR4). The authors suggest TSA synergizes with lapatinib, a tyrosine kinase inhibitor, suggesting the applicability of combined target therapy in breast cancer (Li, 2019).

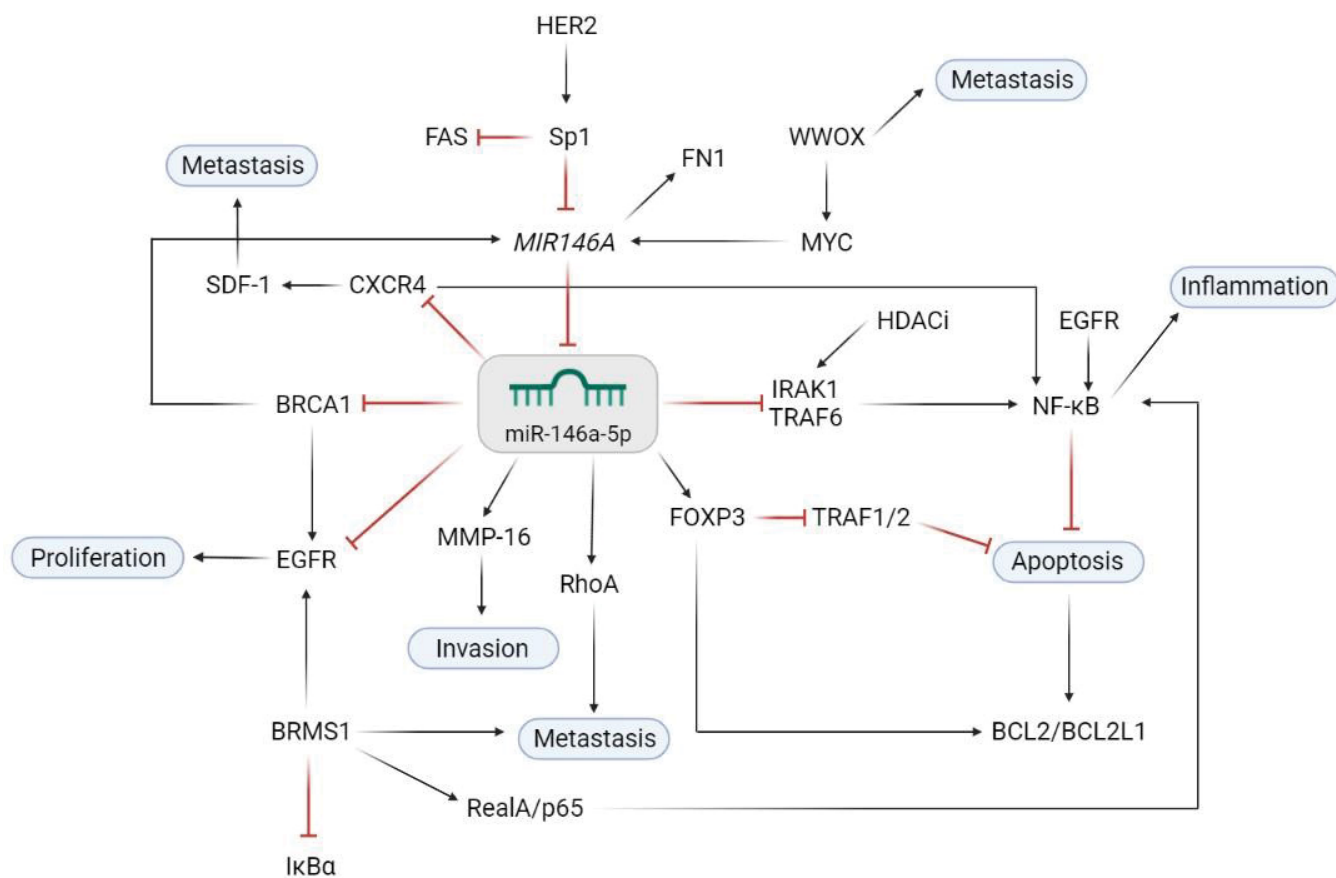


Figure 2. miR-146a, targets and molecules involved in breast cancer initiation and progression.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

MiRNAs exhibit a pleiotropic activity, and here, we show that miR-146a/b plays different roles regulating several phenotypes and target a group of genes tumor cells. Understanding the relation between miR-146a/b and targets can collaborate to improve treatment strategies studies that have as main actors these targets.

Despite the controversial results related in the literature about their roles in breast tumorigenesis, it is possible to propose that miR-146a/b alterations can indicate the tumor process considering an interesting biomarker.

REFERENCES

- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, v. 71, n. 3, p. 209-249. 2021. Doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4.
- SHULMAN, L. N. et al. Breast cancer in developing countries: opportunities for improved survival. *J Oncol.*, v. 2010, p. 595167, 2010.

WHO Guide to cancer early diagnosis. 2017.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/254500>

ELSARRAJ, H. et al. Emerging Functions of microRNA-146a/b in Development and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2012.

LI, Y. et al. Associations of miR-146a and miR-146b expression and breast cancer in very young women. *Cancer Biomark*, v. 15, n. 6, p. 881-7, 2015a

BLENKIRON, C. et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*, v. 8, n. 10, R214, 2007.

CHENG C. et al. mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. *Genome Biol*, v. 10, n. 9, R90, 2009.

PATERSON, R. P; KRIEGLER, A. J. MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiol Genomics*, v. 49, n. 4, p. 243-252, 2017.

TAGANOV, K. D. et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 33, p. 12481-6, 2006.

BHAUMIK, D. et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*, v. 27, n. 42, p. 5643-7, 2008.

MELO, S. A.; ESTELLER, M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett*, v. 585, p. 2087–2099, 2011.

MARKOU, A. et al. Direct Comparison of Metastasis-Related miRNAs Expression Levels in Circulating Tumor Cells, Corresponding Plasma, and Primary Tumors of Breast Cancer Patients. *Clin Chem*, v. 62, n. 7, p. 1002-11, 2016.

M'HAMED, I. F. et al. miR-10b, miR-26a, miR-146a And miR-153 Expression in Triple Negative Vs Non Triple Negative Breast Cancer: Potential Biomarkers. *Pathol Oncol Res*, v. 23, n. 4, p. 815-827, 2015.

BAI, G. et al., 2019. Research on the Correlation Between microRNA-146a Expression and Clinical Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Acta Medica Mediterranea*, v. 35, p. 2247, 2019.

LIU, Q. et al., 2016. MicroRNA-146a inhibits cell migration and invasion by targeting RhoA in breast cancer. *Oncol Rep*, v. 36, n. 1, p. 189-96, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, p.57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

CHANG, S.K. et al. BRCA1 and microRNAs: emerging networks and potential therapeutic targets. *Mol. Cells*, v. 34, p. 425–432, 2012.

GARCIA, M. et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol. Med*, v. 3, p. 279–290, 2011.

GAO, W. et al. Expression of miR-146a-5p in breast cancer and its role in proliferation of breast cancer cells. *Oncology Letters*, v. 15, p. 9884-9888, 2018

ZAVALA, V. et al. miR-146a and miR-638 in BRCA1-deficient triple negative breast cancer tumors, as potential biomarkers for improved overall survival. *Cancer Biomarkers*, v.16, p. 99–107, 2016.

KUMARASWAMY, E. et al. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene*, v. 34, n.33, p. 4333–46, 2015.

TAO, S. F. et al. Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, v. 402, n. 1-2, p. 93-100, 2015.

HUEN, M. S. et al. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 11, p. 138–148, 2010.

GORSKI, J. J. et al. BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v. 122, p. 721–731, 2010.

SILVER, D. P. et al. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discov*, v. 2, p. 679–684, 2012.

SCHLESSINGER J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, v. 103, p. 211–225, 2000.

YARDEN, Y. et al. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*; v. 37, p. S3–S8, 2001

HUANG, L. et al. Phosphoaspirin (MDC-22) inhibits breast cancer in preclinical animal models: an effect mediated by EGFR inhibition, p53 acetylation and oxidative stress. *BMC Cancer*, v. 14, p. 141, 2014.

DU, W. W. et al. MicroRNA miR-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting PTPN9 and PTPRF to promote EGF signaling. *J Cell Sci*, v. 126, p. 1440–1453, 2013.

MU, Z. et al. AZD8931, an equipotent, reversible inhibitor of signaling by epidermal growth factor receptor (EGFR), HER2, and HER3: preclinical activity in HER2 nonamplified inflammatory breast cancer models. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 33, p. 47, 2014.

SAINSBURY, J. R. et al. Epidermal-growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*, v. 1, p. 1398–1402, 1987.

RIMAWI, M. F. et al. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer*, v. 116, p. 1234–1242, 2010.

VIALE, G. et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast Cancer Res Treat*, v. 116, p. 317–328, 2009.

LI, Y. et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, v. 70, p. 1486–1495, 2010.

XU B, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERKdependent manner in castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, v. 72, p. 1171–1178. 2011.

TOYAMA, T. et al. Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer*, v. 8, n. 309, 2008.

COLLINS LC, Martyniak A, Kandel MJ, Stadler ZK, Masciari S, Miron A, et al. Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am. J. Surg. Pathol.* 2009; 33: 1093-7.

RAKHA, E. A. et al. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*, v. 41. p. 40-7, 2007.

TANIC, M. et al. Integration of BRCA1-mediated miRNA and mRNA profiles reveals microRNA regulation of TRAF2 and NFkB pathway. *Breast Cancer Res Treat*, v. 134, n. 1, p. 41-51, 2012.

ZHANG, X. et al. Expression of IRAK1 in lung cancer tissues and its clinicopathological significance: A microarray study. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 7, p. 8096-8104, 2014.

WEE, Z. N. et al. IRAK1 is a therapeutic target that drives breast cancer metastasis and resistance to paclitaxel. *Nat Commun*, v. 6, p. 8746, 2015

YE, Z. H. et al. Diagnostic and prognostic roles of IRAK1 in hepatocellular carcinoma tissues: An analysis of immunohistochemistry and RNA-sequencing data from the cancer genome atlas. *Onco Targets Ther*, v. 10, p.1711-1723, 2017.

WANG, Y. et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 correlates with metastasis and invasion in endometrial carcinoma. *J Cell Biochem*, v. 119, p. 2545-2555, 2018

LONG, J. P. et al. miR-146a-5p targets interleukin-1 receptor-associated kinase 1 to inhibit the growth, migration, and invasion of breast cancer cells. *Oncology Letters*, v. 17, p.1573-1580, 2019

ZHANG, S. et al. Suppression of human ovarian carcinoma metastasis by the metastasis suppressor gene. BRMS1. *Int J Gynecol Cancer*, v. 16, p. 522–31, 2016.

BODENSTINE, M. et al. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*, v. 1, p. 1–11, 2018

HURST, D. R. et al. Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008, v. 283, p. 7438–44, 2008.

PHADKE, P. A. et al. BRMS1 suppresses breast cancer experimental metastasis to multiple organs by inhibiting several steps of the metastatic process. *Am J Pathol*, v. 172, p.809–17, 2008.

STAFFORD, L. J. et al. Metastasis suppressors genes in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 40, p. 874–91, 2008.

HICKS, D. G. et al. Loss of BRMS1 protein expression predicts reduced diseasefree survival in hormone receptor negative and HER2 positive subsets of breast cancer. *Clin Cancer*, v. 12, p. 6702–8, 2006.

LOMBARDI, G. et al. High level of messenger RNA for BRMS1 in primary breast carcinomas is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*, v. 120, p. 1169–78, 2006.

KODURA, M. A. et al. Breast carcinoma metastasis suppressor gene 1 (BRMS1): update on its role as the suppressor of cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 34, p. 611–8, 2015

WELCH, D. et al. Chapter four-breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1): robust biological and pathological data, but still enigmatic mechanism of action. *Adv Cancer Res*, v. 132, p. 111–37, 2016.

HEDLEY, B. D. et al. Down-regulation of osteopontin contributes to metastasis suppression by breast cancer metastasis suppressor 1. *Int J Cancer*, v. 123, p. 526–34, 2008.

VAIDYA, K. S. et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 differentially modulates growth factor signaling. *J Biol Chem*, v. 283, p. 28354–60, 2008.

CICEK, M. et al. Fukuyama R, Welch DR, Sizemore N, Casey G. Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor- κ B activity. *Cancer Res*, v. 65, p. 3586–95, 2005.

LIU, Y. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 functions as a corepressor by enhancing histone deacetylase 1-mediated deacetylation of RelA/p65 and promoting apoptosis. *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 8683–96, 2006.

HASHEMI. et al. Additive effect of metastamiR-193b and breast cancer metastasis suppressor 1 as an anti-metastatic strategy. *Breast Cancer*, v. 26, p. 215–228, 2019.

HURST. et al. Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 Up-regulates miR-146, Which Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res*, v. 69, n. 4, p. 1279–1283, 2009a.

EDMONDS. et al Breast cancer metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expression. *Int J Cancer*, v. 125, n. 8, p. 1778–1785, 2009.

LIU, Q. et al. MicroRNA-146a inhibits cell migration and invasion by targeting RhoA in breast cancer. *Oncol Rep*, v. 36, n. 1, p. 189-96, 2016

LIU, Q. et al. Triptolide Inhibits Breast Cancer Cell Metastasis Through Inducing the Expression of miR-146a, a Negative Regulator of Rho GTPase. *Oncol Res*, v. 27, n. 9, p. 1043-1050, 2019.

KHAWALED, S. et al. WWOX inhibits metastasis of triple-negative breast cancer cells via modulation of microRNAs. *Cancer Res*, v. 79, n. 8, p. 1784-1798, 2019.

ZHENG, T. et al. CXCR4 3UTR functions as a ceRNA in promoting metastasis, proliferation and survival of MCF-7 cells by regulating miR-146a activity. *Eur J Cell Biol*, v. 94, n. 10, p. 458-69, 2015.

ALSAYED, Y. et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*, v. 109, p. 2708-2717, 2007.

COJOC, M. et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets Ther*, v.6, p. 1347-1361, 2013.

SUN, Y. et al. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol*, v. 35, p. 7765-7773, 2014.

ARAVINDAN, B.K. et al. The role of chemokine receptor 4 and its ligand stromal cell derived factor 1 in breast cancer. *Ann. Transl. Med.*, v. 3, n. 23, 2015.

AL-SOUHIBANI, N. et al. Posttranscriptional control of the chemokine receptor CXCR4 expression in cancer cells. *Carcinogenesis*, v. 35, p. 1983-1992, 2014.

BUSILLO, J. M. et al. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*, v. 1768, p. 952-63, 2007.

KIM, S.Y. et al. Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis*, v. 25, p. 201-11, 2008.

LABBAYE, C. et al. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat. Cell Biol*, v. 10, p. 788-801, 2008.

WANG, D. et al. TRAIL-induced miR-146a expression suppresses CXCR4-mediated human breast cancer migration. *FEBS J*, v. 280, p. 3340-53, 2013.

HURST, D.R. et al. Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res*, v. 69, p. 7495-8. 2009b

ALI, S. et al. Deregulation of miR-146a expression in a mouse model of pancreatic cancer affecting EGFR signaling. *Cancer Lett*, v. 351, p. 134-142, 2014.

LI, G. et al. Sp1-mediated epigenetic dysregulation dictates HDAC inhibitor susceptibility of HER2-overexpressing breast cancer. *Int J Cancer*, v. 145, n. 12, p. 3285-3298, 2019.

LI, Y. et al. Functions of miR-146a and miR-222 in Tumor-associated Macrophages in Breast Cancer. *Sci Rep*, v. 5, p.18648, 2015b

MODAL, S. et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem*, v. 194, p. 112260, 2020.

LI, C. et al. Catalpol suppresses proliferation and facilitates apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through upregulating microRNA-146a and downregulating matrix metalloproteinase-16 expression. *Mol Med Rep*, v. 12, n. 5, p. 7609-14 2015c.

APÊNDICE 3 – Participação em trabalhos no período de realização do doutorado (2018-2021)

- Co-autoria no artigo “*Long Non-Coding RNAs in Multifactorial Diseases: Another Layer of Complexity*” publicado na revista *Non-Coding RNA* em 2018.
(DOI: 10.3390/ncrna4020013).
- Co-autoria no artigo “*Long non-coding RNAs in cancer: Another layer of complexity*” publicado na revista *The Journal of Gene Medicine* em 2019.
(DOI: 10.1002/jgm.3065)
- Co-autoria no artigo “*Association of FOSL1 copy number alteration and triple negative breast tumors*” publicado na revista *Genetics and Molecular Biology* em 2019.
(DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0267)
- Co-autoria no artigo: “*A novel lncRNA derived from an ultraconserved region: Lnc-uc.147, a potential biomarker in luminal A breast cancer?*” publicado na revista *RNA Biology* em 2021.
(DOI: 10.1080/15476286.2021.1952757)
- Co-autoria no capítulo “*Sirtuins and the hallmarks of cancer*” do livro “*Sirtuin Biology in Cancer and Metabolic Disease*” publicado pela Elsevier em 2021.
(DOI: 10.1016/B978-0-12-822467-0.00013-9)
- Co-autoria no artigo “*From Micro to Long: Non-Coding RNAs in Tamoxifen Resistance of Breast Cancer Cells*” na revista *Cancers* em 2021.
(DOI: 10.3390/cancers13153688)

9. ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE

Nós, Prof^ª. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Prof^º Dr. Cícero de Andrade Urban, Prof^ª Dra. Danielle Malheiros Ferreira, Prof^ª Ilce Mara de Syllos Cólus e Me. Patricia Midori Murobushi Ozawa, responsáveis pelo projeto que será executado pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, da Universidade Federal do Paraná, convidamos o(a) senhor(a), a participar de um estudo intitulado “*Identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico por métodos não invasivos em portadores de carcinomas primários de mama e de próstata*”, na qualidade de indivíduo controle.

Biomarcadores são moléculas presentes no organismo de indivíduos com uma condição específica (neste caso, câncer de mama ou de próstata) e que permitem realizar a sua distinção de indivíduos livres dessa condição. A identificação destas moléculas permite o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico não invasivo, ou seja, em que não é necessária uma biópsia do tumor, o que pode favorecer a detecção precoce da doença. Além do diagnóstico precoce, a identificação destes biomarcadores pode também, no futuro, auxiliar os médicos responsáveis a categorizar melhor o tipo de câncer de cada paciente e desta forma decidir com maior precisão o tipo de tratamento.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é identificar biomarcadores presentes no soro de pacientes com câncer de mama e próstata, que sejam capazes de auxiliar no diagnóstico, classificação, tratamento e prognóstico. É importante ressaltar que este grupo realiza pesquisa básica, sendo que os dados obtidos a partir deste estudo serão dados preliminares e que não serão imediatamente implementados na clínica. Para que esses biomarcadores sejam implementados há a necessidade de estudos adicionais e comprovação de sua eficácia pela comunidade científica. Portanto, não há benefício imediato aos pacientes e tampouco risco de identificação genética de qualquer natureza.

Caso você decida participar da pesquisa, é necessário ter mais de 18 anos, não possuir histórico pessoal de câncer e nem suspeita familiar de câncer hereditário e será necessário permitir a coleta de alíquota de sangue (1 tubo de soro de 8ml), bem como conceder informações a respeito da sua idade, e condições de saúde (se possui outro algum tipo de doença como diabetes e doenças autoimunes) e se está fazendo uso de medicamento de uso contínuo.

Essas amostras serão obtidas momentos após a abordagem médica durante a acompanhamento de consulta a um paciente ou mediante voluntariado, o que não levará mais do que 10 minutos. É possível que você experimente algum

desconforto, principalmente relacionado ao local de onde será retirado o sangue. É possível que surja uma mancha arroxeadada no local da introdução da agulha, mas ela desaparecerá ao longo dos dias, mas se o(a) senhor(a) desejar poder ser aplicada uma pomada no local para facilitar o desaparecimento da mancha. O material obtido, sangue periférico (obtido por punção venosa), será utilizado unicamente para essa pesquisa e será consumido inteiramente durante o estudo.

Os benefícios esperados com essa pesquisa incluem o desenvolvimento de métodos não invasivos (sem necessidade de biópsia) de identificação precoce de indivíduos com câncer de mama e próstata, ou que classifiquem melhor os pacientes dentro de subgrupos, contribuindo para o direcionamento do tratamento. Esclarecemos que embora seja uma pesquisa genética, as informações que serão obtidas não se constituem em parâmetros hereditários e não são transmitidos para futuras gerações, portanto não há necessidade de aconselhamento genético nem de outro tipo de preocupação ou cuidado.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, sala 25, da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, fone (41) 3361-1728, no horário das 9h às 17h (ou a qualquer momento no e-mail eribeiro@ufpr.br) para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se o(a) senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como o pesquisador responsável, o médico e a aluna de pós-graduação envolvida na pesquisa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que **a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como o transporte do material biológico do hospital até a universidade e todos os reagentes utilizados durante a pesquisa, não são de sua responsabilidade e o(a) senhor(a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, _____ de _____ de _____.

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE

Nós, Prof^a. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Prof^o Dr. Cícero de Andrade Urban, Prof^a Dra. Danielle Malheiros Ferreira, Prof^a Ilce Mara de Syllos Cólus e Me. Patricia Midori Murobushi Ozawa, responsáveis pelo projeto que será executado pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, da Universidade Federal do Paraná, convidamos a senhora, paciente com histórico pessoal de câncer de mama a participar de um estudo intitulado “*Identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico por métodos não invasivos em portadores de carcinomas primários de mama e de próstata*”.

Biomarcadores são moléculas presentes no organismo de indivíduos com uma condição específica (neste caso, câncer de mama) e que permitem realizar a sua distinção de indivíduos livres dessa condição. A identificação destas moléculas permite o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico não invasivo, ou seja, em que não é necessária uma biópsia do tumor, o que pode favorecer a detecção precoce da doença. Além do diagnóstico precoce, a identificação destes biomarcadores pode também, no futuro, auxiliar os médicos responsáveis a categorizar melhor o tipo de câncer de cada paciente e desta forma decidir com maior precisão o tipo de tratamento.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é identificar biomarcadores presentes no soro de pacientes com câncer de mama e próstata, que sejam capazes de auxiliar no diagnóstico, classificação, tratamento e prognóstico. É importante ressaltar que este grupo realiza pesquisa básica, sendo que os dados obtidos a partir deste estudo serão dados preliminares e que não serão imediatamente implementados na clínica. Para que esses biomarcadores sejam implementados há a necessidade de estudos adicionais e comprovação de sua

eficácia pela comunidade científica. Portanto, não há benefício imediato aos pacientes e tampouco risco de identificação genética de qualquer natureza.

Caso você decida participar da pesquisa, é necessário ter mais de 18 anos e será necessário permitir a coleta de alíquotas de sangue (1 tubo de soro de 8ml), bem como conceder permissão para consulta de seu prontuário e resultados de exames. As informações que serão consultadas serão: idade, grau do tumor, tamanho do tumor, presença ou ausência de metástases em linfonodos ou à distância.

Essas amostras serão obtidas momentos antes da cirurgia para retirada do tumor e, para alguns pacientes que serão selecionados após as primeiras análises, após alguma consulta médica de retorno, o que não levará mais do que 10 minutos. É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao local de onde será retirado o sangue. É possível que surja uma mancha arroxada no local da introdução da agulha, mas ela desaparecerá ao longo dos dias, mas se a senhora desejar pode ser aplicada uma pomada no local para facilitar o desaparecimento da mancha. O material obtido, sangue periférico (obtido por punção venosa), será utilizado unicamente para essa pesquisa e será consumido inteiramente durante o estudo.

Os benefícios esperados com essa pesquisa incluem o desenvolvimento de métodos não invasivos (sem necessidade de biópsia) de identificação precoce de indivíduos com câncer de mama e próstata, ou que classifiquem melhor os pacientes dentro de subgrupos, contribuindo para o direcionamento do tratamento. Esclarecemos que embora seja uma pesquisa genética, as informações que serão obtidas não se constituem em parâmetros hereditários e não são transmitidos para futuras gerações, portanto não há necessidade de aconselhamento genético nem de outro tipo de preocupação ou cuidado.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, sala 25, da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, fone (41) 3361-1728, no horário das 9h às 17h (ou a qualquer momento no e-mail eribeiro@ufpr.br) para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se a senhora não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como o pesquisador responsável, o médico e a aluna de pós-graduação envolvida na pesquisa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que **a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como o transporte do material biológico do hospital até a universidade e todos os reagentes utilizados

durante a pesquisa, não são de sua responsabilidade e a senhora não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de ____.

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

ANEXO 2 – PROTOCOLO DO PROCESSO DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS DE CANCER DE MAMA

- Ressuspensão do *mimic* comercial:
 1. Limpar muito bem o fluxo laminar com álcool 70%, separar recipiente com tubos de 0,5mL novos e autoclavados, caixa de ponteiros 200uL com filtro;
 2. Deixar a luz UV ligada por 15 minutos;
 3. Ligar o fluxo laminar pelo menos 2 minutos antes do uso para circulação do ar;
 4. O kit é composto por um tubo com o *mimic* vem liofilizado (5 nmoles) e um tubo de água para a diluição;
 5. Centrifugar o tubo do *mimic* por 5 minutos a 1500rpm antes de ressuspender.
 6. Ressuspender o *mimic* em 50 μ L de água do kit. Esse será o ESTOQUE ORIGINAL (100uM/L ou 100pmoles/uL);
 7. Congelar por, no mínimo, 24 horas em -20°C;
 8. No dia seguinte, realizar o mesmo procedimento para preparar a ALÍQUOTA DE USO;
 9. Para isso deve-se pegar 5 μ L do ESTOQUE ORIGINAL e adicionar em 45 μ L de água do kit (10uM/L ou 10pmoles/uL).
- Em uma placa de 6 poços serão usados 4 poços sendo um para o *mimic*, controle negativo (CT-), controle da Lipofectamina (Lipo), e controle das células sem tratamento (ST).
- Tubo para diluição da Lipofectamina: Lipofectamina + Opti-MEM
 1. Calcular para 1x + 20%;
 2. Adicionar: 6 μ L de Lipofectamina (5 μ L + 20%) em 150 μ L de meio Opti-MEM (125 μ L + 20%);
 3. Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Tubo para diluição do *mimic* miRNA e Controle negativo: *mimic*/controle + Opti-MEM
 1. Calcular para 1x + 10%;
 2. Fazer os tubos:

Tubo mimic: 2,75 µL de *mimic* miRNA (2,5 + 10%) em 137,5 µL de Opti-MEM (125 + 10%)

Tubo Controle (-): 2,75 uL de CT(-) (2,5 +10%) em 137,5uL de Opti-MEM (125 + 10%)

3. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente.

- Tubo final: *mimic* miRNA/CT- + Opti-MEM + Lipofectamina

1. Adicionar 137,5uL da Lipofectamina diluída em Opti-MEM nos tubos referentes aos poços da placa;
2. Incubar por 20 minutos à temperatura ambiente.

- Na placa:

1. Na placa adicionar 750 µl de células em todos os poços a serem usados;
2. Adicionar 250 µl do tubo final (*mimic*/CT- + Lipofectamina + Opti-MEM);
3. O volume final de cada poço será de 1 mL;
4. Incubar por 4h na estufa (37°C, 5% CO₂);
5. Após esse período de incubação, retirar o sobrenadante com e adicionar 2 mL de meio DMEM com antibiótico retornando a placa para a estufa.

- Coleta das células: Coletar as células nos tempos de 48h e/ou 72h após a transfeccção do *mimic* miRNA.

1. Retirar com cuidado o sobrenadante;
2. Lavar com 2 mL de PBS;
3. Adicionar 500 µl de tripsina;
4. Incubar 3 minutos na estufa;
5. Adicionar 500 µl meio DMEM;
6. Retirar o sobrenadante e transferir para um tubo;
7. Centrifugar por 4 minutos a 1500 rpm;
8. Adicionar 1 mL de Trizol e guardar obotão de células para posterior extração de RNA;
9. Adicionar 2 mL de DMEM nos poços e devolver a placa na estufa;
10. Após 24h repetir todo esse processo de coleta.

ANEXO 3 – PROTOCOLO DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

- Após processo de transfeccção, desaderir as células e realizar a contagem;
- Em uma placa de 96 poços adicionar 2.000 células em um volume de 100 µl para cada poço a ser usado (quintuplicata);
- Adicionar 10% do volume do poço de Resazurina no dia da leitura e deixar a placa 4h na estufa;
- Realizar a leitura de absorbância.

ANEXO 4 – PROTOCOLO DO ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

- Em uma placa de 6 poços adicionar 500 - 1000 células em cada poço a ser usado (triplicata);
- Adicionar 2 mL de meio DMEM;
- Deixar a placa de 15 – 30 dias na estufa;
- Realizar a contagem das colônias por meio da coloração com cristal violeta.

ANEXO 4 – PROTOCOLO DO ENSAIO DE APOPTOSE

1. Coletar o meio de cada poço da placa de transfecção e reservar em tubo;
2. Lavar os poços com PBS gelado;
3. Realizar a desadesão das células;
4. Ressuspender o botão de células com o meio reservado e transferir para os tubos centrifugando novamente;
5. Descartar o sobrenadante em 100 µl de Annexin-Binding Buffer 1x
6. Adicionar 5 µl de Alexa Fluor 488 Annexin V

7. Adicionar 1 μ l da solução uso de PI;
8. Incubar em temperatura ambiente no escuro por 15 minutos;
9. Adicionar 400 μ l de Annexin-Biding Buffer 1x;
10. Deixar em gelo e analisar em citômetro de fluxo.

ANEXO 5 – PROTOCOLO NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO

- Em uma placa de 96 poços adicionar 35.000 células em um volume de 100 μ l de DMEM completo e colocar na estufa por 24h;
- Após esse período, espera-se que a confluência das células esteja 95-100 %;
 1. Retirar o meio com cuidado e lavar o poço uma vez com PBS;
 2. Adicionar a mitomicina (20 μ g/mL) para a parada da proliferação celular em cada poço e deixar por 2h em estufa;
 3. Em seguida, realizar um risco vertical no centro do poço com ponteira de 10 μ l
 4. Lavar duas vezes com meio DMEM deixando, ao final, 50 μ l de meio;
 5. Analisar em microscópio acoplado a câmera fotográfica a cada intervalo de 2 a 6h dependendo da linhagem celular usada.