

Ana Laura Rodrigues

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM LINHAGENS CELULARES
DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO EXPOSTAS A AÇÃO DO FÁRMACO
CEDIRANIB**

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação PIO XII - Hospital de
Câncer de Barretos para obtenção do
título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profa. Dra. Márcia Maria
Chiquitelli Marques Silveira

Barretos, SP

2013

Ana Laura Rodrigues

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM LINHAGENS CELULARES
DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO EXPOSTAS A AÇÃO DO FÁRMACO
CEDIRANIB**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação PIO XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Barretos, SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Tatiana Messias Freitas da Costa

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

R696a Rodrigues, Ana Laura.

Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma mamário humano expostas a ação do fármaco cediranib. / Ana Laura Rodrigues. - Barretos, SP 2013.

113 f. : il.

Orientador: Dr^a. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2013.

1. Técnicas de cultura de células. 2. Neoplasias da mama. 3. Metástase neoplásica. 4. Expressão Gênica. 5. Polymerase Chain Reaction (PCR). 6. microRNAs. I. Autor. II. Silveira, Márcia Maria Chiquitelli Marques. III. Título.

CDD 572.88

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Laura Rodrigues

Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma mamário humano expostas a ação do fármaco cediranib

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 26/08/2013

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Denise Peixoto Guimarães

Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Instituição: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Prof.^a Dra. Celine Marques Pinheiro

Instituição: Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos - FACISB

Prof.^a Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Orientadora

Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Presidente da Banca Examinadora

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2010/16796-0).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Esta dissertação foi elaborada e se apresenta de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

*Aos meus queridos pais, José
Lutero e Laura que sempre
estiveram presentes nos
momentos mais difíceis e são
os alicerces da minha vida.*

*A meu marido Rodrigo pelo
amor e apoio para que eu
pudesse concretizar essa
etapa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aquele que me deu forças e me guiou para que eu cumprisse com essa etapa.

Aos meus pais, **José Lutero Rodrigues** e **Laura Bruno Rodrigues**, por serem meus verdadeiros mestres, exemplos de sabedoria e conduta, pelo amor incondicional, pela compreensão e confiança, sem vocês eu nunca teria chegado até aqui. Aos meus irmãos, **Junior e Eduardo**, amigos e exemplos que carrego em meu coração, e a família linda que construíram. Ao meu marido, **Rodrigo Bordinhão**, pela paciência e respeito nos inúmeros momentos em que estive ausente, por acreditar, apoiar e me levantar nos momentos mais difíceis, em que sozinha, eu não conseguiria.

À **Dra Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira**, pela orientação e oportunidade a mim proporcionada de explorar novos caminhos, de vivenciar experiências intensas, possibilitando meu crescimento profissional para que eu me tornasse mais próxima de um objetivo maior. Obrigada por acreditar que eu seria capaz de cumprir esse desafio.

Ao **Dr Rui Reis**, pela contribuição intelectual e por fornecer as linhagens celulares que viabilizaram esse estudo.

À **Dra Adriane Feijó Evangelista**, pela amizade e por contribuir com seus ensinamentos científicos e de vida. Por toda a significativa contribuição para este trabalho.

À **Dra Olga Martinho**, por toda a disponibilidade em responder minhas dúvidas, por me acompanhar a executar técnicas quando me senti insegura, por acreditar sempre que eu conseguiria, por enxergar além e transmitir seus conhecimentos, conquistando minha amizade, admiração e respeito.

Ao **Ms Renato Oliveira**, pela amizade, paciência, explicações e ensinamentos constantes. Mas, principalmente por estar sempre presente nos momentos mais desafiadores e por toda a significativa contribuição para este trabalho.

Aos amigos de equipe; ao **Augusto Ludvik**, pelas risadas, discussões científicas, filosóficas e sonhos compartilhados. À **Taciane Macedo**, pela cumplicidade, lágrimas,

vitórias, incentivos e admiração mútua. A nossa amizade, foi um dos maiores bônus a mim proporcionado e levarei por toda a vida, obrigada por ser tão especial!

Aos amigos **Maicon Zanon** e **Dra Viviane Aline O. Silva**, pela compreensão e afinidade além das palavras, pelos exemplos de dedicação e humildade, virtudes reconhecidas por muitos, porém executadas por poucos.

Agradeço a convivência com **todos os alunos e funcionários do CPOM** (André, “Adrianas”, Abel, Alessandra, Aline, Carolina Laus, Fernanda, Lídia, Letícia, Marcela, Matias, “Natálias”, Rodolfo). Em especial à **Flávia Eguchi** por estarmos juntas nessa jornada do início ao fim, pelos “cafés” que funcionavam como terapia, onde compartilhamos muito e renovamos nossas energias.

Ao programa de pós-graduação do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, especialmente **ao coordenador Dr. Adhemar Longatto, ao diretor executivo do IEP Dr. André Carvalho.**

A todos os **pesquisadores do CPOM e IEP**, por contribuírem para meu crescimento profissional e científico e também a todo o **departamento da pós-graduação** que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

À Fapesp pelo auxílio financeiro do projeto (processo 2010/16796-0).

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, contribuições, críticas e sugestões.

Aos colegas de pós-graduação e a todos que passaram por minha vida e o seu melhor a mim deixaram, entre eles amigos e familiares.

A todos aqueles que não acreditaram e mesmo sem perceber, deixaram transparecer. Vocês me tornaram mais forte, meus sinceros agradecimentos.

Me permito finalizar esses agradecimentos com uma frase de **Dalai Lama**: *“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”*

*“Julgue seu sucesso pelas coisas que você
teve que renunciar para conseguir.”*

Dalai Lama

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Epidemiologia e desenvolvimento do câncer de mama	01
1.2	Evolução do tratamento farmacológico no câncer de mama	03
1.3	Cediranib e os avanços no tratamento do câncer	05
1.4	Regulação da expressão gênica por microRNAs e o câncer	08
1.5	MicroRNAs como moduladores de resposta a fármacos anti-neoplásicos	13
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CIENTÍFICA	
2.1	Justificativa	18
2.2	Hipótese	18
3	OBJETIVOS	
3.1	Objetivo Geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
4.1	Fluxograma de trabalho	22
5	MATERIAL E MÉTODOS	
5.1	Aspecto Ético	24
5.2	Linhagens Celulares	24
5.3	Ensaio para determinação da viabilidade celular (ensaios basais)	25
5.4	Determinação da concentração máxima capaz de inibir metade da proliferação (IC50)	26
5.5	Ensaio de migração celular	27

5.6	Ensaio de invasão celular	27
5.7	Extração e quantificação do RNA total das linhagens celulares	29
5.7.1	Avaliação da quantidade e qualidade do RNA total	30
5.8	MicroRNAs <i>microarrays</i>	32
5.8.1	Análise dos dados de <i>microarrays</i>	35
5.9	Confirmação dos microRNAs diferencialmente expressos por PCR em tempo real (qRT-PCR)	37
5.10	Análise dos dados de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	38
6	RESULTADOS	
6.1	Avaliação da viabilidade celular (ensaios basais) e determinação da concentração máxima capaz de inibir metade da proliferação (IC50) ao Cediranib	40
6.2	Avaliação da capacidade de migração celular <i>in vitro</i> das linhagens tumorigênicas expostas ao Cediranib	45
6.3	Avaliação da capacidade de invasão celular <i>in vitro</i> das linhagens tumorigênicas expostas ao Cediranib	48
6.4	Perfis de expressão diferencial de miRNAs em linhagens tumorigênicas de mama expostas ao Cediranib	51
6.5	Confirmação dos miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens tumorigênicas de mama por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	62
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÕES	75
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ANEXOS

Anexo A – Folha de submissão do artigo científico

88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de ação do fármaco Cediranib (AZD2171) como inibidor de receptores VEGF 1, 2 e 3, bloqueando a angiogênese e linfangiogênese.	6
Figura 2 -	Biogênese e mecanismo de regulação da expressão gênica dos microRNAs em células de mamíferos.	9
Figura 3 -	Modelo do envolvimento dos miRNAs no câncer de mama pela modulação da expressão de genes supressores tumorais e oncogenes	11
Figura 4 -	MicroRNAs funcionalmente envolvidos na progressão do câncer.	14
Figura 5 -	Modelo do ensaio de invasão celular <i>in vitro</i> .	28
Figura 6 -	Fluxograma para preparação dos RNA <i>Nano Chip</i> .	32
Figura 7 -	MicroRNA Microarrays.	33
Figura 8 -	Percentual de células viáveis, obtido a partir dos ensaios basais realizados na linhagem Hs578T.	41
Figura 9 -	Percentual de células viáveis, obtido a partir dos ensaios basais	42

realizados na linhagem MDA-MB-231.

- Figura 10** - Percentual de células viáveis, obtido a partir dos ensaios basais realizados na linhagem T47D. 43
- Figura 11** - Representação gráfica dos valores calculados de IC50 em escala log2 para as três linhagens celulares de carcinoma mamário humano. 44
- Figura 12** - Imagens obtidas a partir dos ensaios de migração realizados nas diferentes linhagens celulares com e sem o fármaco (dose IC50). 45
- Figura 13** - Quantificação do percentual de migração celular *in vitro*. 47
- Figura 14** - Imagens obtidas a partir dos ensaios de invasão realizados nas diferentes linhagens celulares com e sem o fármaco (dose IC50). 49
- Figura 15** - Quantificação do percentual de invasão celular *in vitro*. 50
- Figura 16** - Assinaturas de expressão (*heat maps*) de miRNAs apontados como diferencialmente expressos nas linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor. 52
- Figura 17** - Diagrama de Venn apontando os miRNAs diferencialmente expressos específicos de cada linhagem tumorigênica e comuns as três linhagens, quando expostas a ação do Cediranib. 53
- Figura 18** - Representação esquemática dos processos biológicos dos alvos dos miRNAs induzidos (vermelho) e reprimidos (verde) após 55

exposição *in vitro* ao Cediranib nas três linhagens de estudo, Hs578T, MDA-MB-231 e T47D.

- Figura 19** - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs induzidos na linhagem Hs578T após exposição ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções. 56
- Figura 20** - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs reprimidos na linhagem Hs578T após exposição *in vitro* ao Cediranib, de acordo com a similaridade de funções. 57
- Figura 21** - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs induzidos na linhagem MDA-MB-231 expostas *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções. 58
- Figura 22** - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs reprimidos na linhagem MDA-MB-231 exposta *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções. 59
- Figura 23** - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs induzidos na linhagem T47D exposta *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções. 60
- Figura 24** - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs reprimidos na linhagem T47D exposta *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções. 61
- Figura 25** - Confirmação dos dados de microarrays por PCR em Tempo Real para os miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens 63

tumorigênicas de mama expostas ao Cediranib ($p \leq 0,005$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subtipos de câncer de mama por critérios imunohistoquímicos.	3
Tabela 2 - Características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama.	25
Tabela 3 - IC50 do Cediranib em linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Coleção de cultura Americana
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CDK4/CDK6	Ciclina dependente de quinase 4 e 6 (respectivamente)
CIP	Fosfatase de intestino de cabra
c-KIT	Gene codificador ao receptor tirosina quinase tipo III
CK5/6	Citoceratina 5 e 6 (respectivamente)
Cy ³	Cianina 3
CO ₂	Dióxido de carbono
DISH	Hibridização dupla in situ
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ERK	Quinases reguladoras de sinal extracelular
IC ₅₀	Concentração máxima capaz de inibir metade da proliferação celular

INCA	Instituto Nacional do Câncer
HER 2	Receptor de fator de crescimento humano 2
HIF	Fator indutor de hipóxia
MEK	Quinase ativada por proteínas RAF
miRNAs	Micro ácido ribonucleico
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RAF	Serina / treonina quinase ativada pela proteína quinase RAS
RAS	GTPase precursora da via das MAP quinases
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SFB	Soro fetal bovino
SuFu	Supressor de fusão homóloga
TGF- β	Fator do crescimento β
TUSC2	Candidato a supressor tumoral 2
UTR	Região não traduzida
PDGFR	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTEN	Fosfatase homóloga a tensina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
+	Positivo (sinal sobrescrito)
-	Negativo (sinal sobrescrito)
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
>	Maior que
<	Menor que
\geq	Maior ou igual a
\leq	Menor ou igual a
B	Beta
K	Kappa

RESUMO

Rodrigues AL. Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma mamário humano expostas a ação do fármaco CEDIRANIB. Hospital de Câncer de Barretos; 2013.

Justificativa O cediranib é um novo fármaco que apresenta resultados promissores no tratamento de alguns tumores sólidos, no entanto, no câncer de mama seus efeitos ainda permanecem desconhecidos. Recentemente, vários trabalhos correlacionam perfis de expressão de miRNAs com a capacidade de resposta a diferentes tratamentos quimioterápicos cujos padrões de expressão estão associados a quimioresistencia ou sensibilidade ao tratamento. **Objetivo:** Avaliar o perfil de expressão diferencial de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor expostas ao Cediranib, por meio da tecnologia de microarrays. **Materiais e Métodos:** Este é um estudo experimental que avaliou o comportamento de linhagens celulares de carcinoma mamário humano frente ao tratamento com o fármaco Cediranib, por meio de ensaios celulares e moleculares. Os ensaios celulares determinaram a capacidade de inibição de crescimento celular (IC50), invasão e migração celular. Além disso, o presente trabalho utilizou a tecnologia de *microarray* e qRT-PCR para avaliar a expressão comparativa de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma mamário humano, após o tratamento com o fármaco Cediranib. **Resultados:** As linhagens de carcinoma mamário humano invasor Hs578T, MDA-MB-231 e T47D são responsivas à ação do Cediranib, *in vitro*. A exposição ao Cediranib leva à diminuição no percentual de migração e invasão celular destas linhagens. Os miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens tumorigênicas durante a exposição ao Cediranib regulam a expressão de genes envolvidos na proliferação e comunicação celular, biossíntese de macromoléculas, metabolismo e morte celular. **Conclusões:** Os nossos resultados mostraram o potencial antineoplásico do Cediranib em linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor e que os miRNAs modulados durante

a exposição a este fármaco estão associados com a regulação de importantes processos biológicos importantes para proliferação e comunicação celular bem como no metabolismo e morte celular.

PALAVRAS- CHAVE: técnicas de cultura de células, neoplasias da mama, metástase neoplásica, expressão gênica, *polymerase Chain Reaction (PCR)*, microRNAs.

ABSTRACT

Rodrigues AL. Molecular signatures of microRNAs of human breast cancer cell lines exposed to the Cediranib. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos Cancer Hospital; 2013.

Background: Cediranib is a new drug that shows promising results in the treatment of solid tumors, however, the effects on the breast cancer remain unknown. Recently several studies correlate expression profiles of miRNAs in response to different chemotherapy treatments whose expression patterns are associated with chemoresistance and sensitivity to treatment.

Objective: Evaluate the differential expression profile of microRNAs in cediranib exposed breast cancer cell lines, using the microarray technology.

Materials and Methods: This is an experimental study that evaluated the behavior of cell lines of human mammary carcinoma to the treatment with the drug cediranib, using cellular and molecular assays. The cellular assays determined the ability to inhibit cell growth (IC50), cell migration and invasion. Furthermore, this study used the microarray technology and qRT-PCR to assess comparative expression of microRNAs in cell lines of human mammary carcinoma after treatment with the drug Cediranib.

Results: Human breast cancer cell lines are responsive to the treatment with Cediranib *in vitro*. Cediranib exposure leads to a decrease in the percentage of cell migration and invasion of these breast cancer cell lines. The miRNAs differentially expressed in the breast cancer cell lines exposed to cediranib regulate the expression of genes involved in proliferation and cellular communication, protein biosynthesis, metabolism and cell death. **Conclusions:** Our results showed the antineoplastic potential of Cediranib in human breast cancer cell lines and the differential expressed miRNAs are associated with the regulation of important biological processes such as cell proliferation and communication as well as metabolism and cell death.

KEYWORDS: Cell Culture Techniques, Breast Neoplasms, Neoplasm Metastasis, Gene Expression, Polymerase Chain Reaction (PCR), microRNA.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e desenvolvimento do câncer de mama

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de mama esperados em 2012 foi de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres, sendo que na região Sudeste, ocorreu maior incidência entre as mulheres com um risco estimado de 69 novos casos por 100 mil habitantes.¹

Quase todas as mortes provocadas por câncer sólidos pode ocorrer como resultado do aparecimento de metástases que consiste na formação de tumores em órgãos secundários distantes tais como o fígado, pulmão, cérebro e ossos ². Este processo envolve múltiplos passos como migração, invasão, disseminação sistêmica e finalmente formação de novos focos de tumor em sítios distantes do corpo dando origem a outro tumor.^{2,3}

Um problema frequente no diagnóstico de tumores de mama é a falta de marcadores biológicos associados a invasão e metástase tumoral. Sabemos que o processo de formação de novos vasos, denominado angiogênese, constitui um importante mecanismo do crescimento tumoral, sendo responsável pelo aporte nutricional às células neoplásicas em proliferação e estabelecendo condições favoráveis para a disseminação metastática. ^{3,4} O processo de angiogênese inicia-se com a degradação local da membrana basal que circunda os capilares, seguido por invasão de estroma pelas células endoteliais subjacentes na direção do sinal angiogênico. As células endoteliais, em seguida, se organizam em estruturas tridimensionais formando novos capilares.⁵ Assim a angiogênese tumoral é um passo necessário para a transição a partir de um pequeno aglomerado de células transformadas para uma grande massa tumoral, sendo também indispensável para propagação, invasão e/ou metástase.⁶

Dentro deste contexto, vale ressaltar que a rápida expansão do tumor cria um ambiente hipóxico, levando a necrose tumoral e induzindo as células neoplásicas

remanescentes a desenvolverem respostas celulares adaptadas, com a produção do fator indutor de hipóxia (HIF) e ativação de mecanismos para sobrevivência do tumor e angiogênese. Células endoteliais quiescentes são, então, ativadas e recrutadas por fatores angiogênicos e estimuladas a proliferar e formar novos vasos sanguíneos.⁷

Muitos tumores que são capazes de superar a baixa tensão de oxigênio e induzir uma neovascularização têm sido relacionados com pior prognóstico.⁷ O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é, portanto, ativado por HIF durante a hipóxia, o que permite a progressão da doença maligna na maioria dos tumores sólidos humanos.⁸

No processo de angiogênese o VEGF desempenha um papel chave,^{4, 9} o seu mecanismo de atuação ocorre por meio de ligação aos receptores de tirosina quinase específicos: VEGFR-1/ Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 e VEGFR-3/Flt-4. Sabe-se que o aumento de expressão do VEGF e seus receptores têm sido associados à progressão, metastização e pior prognóstico em tumores de mama malignos.¹⁰ Dentro do contexto de angiogênese tumoral, vale ressaltar que a família de proteínas VEGF e seus receptores, VEGFR-1, VEGFR-2, e VEGFR-3, são necessárias para a angiogênese tumoral e linfangiogênese.¹¹

Como já discutido, o VEGF é, portanto, um importante indutor de migração, invasão, permeabilidade vascular e formação de novos vasos. Cinco glicoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento epidermal (FGF) ativam os receptores tirosina kinases VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. A superexpressão de fatores angiogênicos em neoplasias malignas humanas tem sido descrita como, por exemplo, a do VEGF-A em carcinomas de pulmão, mama e do pâncreas,^{12 13-15} além de Angiopietina (ANG)-1 em carcinoma hepatocelular.^{16, 17}

Estratégias terapêuticas tendo como alvo o tumor primário são bastante promissoras, no entanto, o tratamento sistêmico na tentativa de prevenir metástases são menos eficazes. Isto porque o longo período de latência entre o tratamento inicial e a recorrência em alguns pacientes com câncer de mama sugerem que este tipo de

tumor pode alterar sua resposta frente a um tratamento, por meio de mecanismos celulares e moleculares que favoreçam a progressão da doença.²

1.2 Evolução do tratamento farmacológico no câncer de mama

Um problema frequente no tratamento do câncer de mama é que, embora muitas terapias antineoplásicas exerçam importante papel no controle do aumento da massa tumoral, na maioria dos casos este efeito não é muito duradouro.¹⁸

Os recentes avanços na identificação dos subtipos moleculares de câncer de mama permitiram classificar o câncer de mama de acordo com os critérios imunohistoquímicos, além de promoverem avanços terapêuticos e de prognóstico.¹⁹

Tabela 1 - Subtipos de câncer de mama por critérios imunohistoquímicos.

Critério e subtipo	RE	RP	HER2	CK5/6	EGFR	Ki67
Critério para resultado positivo	>1% para o núcleo	>1% para o núcleo	Teste Hercep 3+ ou 2+ e razão de FISH >2	Corado no citoplasma ou membrana	Corado no citoplasma ou membrana	≥14% do núcleo tumoral
Luminal A	RE ou RP positivo		Negativo	Qualquer	Qualquer	Negativo
Luminal B	RE ou RP positivo		Negativo	Qualquer	Qualquer	Positivo
Luminal HER2	RE ou RP positivo		Positivo	Qualquer	Qualquer	Qualquer
HER2+	Negativo	Negativo	Positivo	Qualquer	Qualquer	Qualquer
Basaloide	Negativo	Negativo	Negativo	CK 5/6 ou EGFR positivo		Qualquer
Triplo negativo (não basaloide)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Qualquer

Fonte: Referência ²⁰. RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, CK5/6: citoceratina 5/6, EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico. Ki67: marcador de proliferação.

Estudos recentes mostram que pacientes com câncer de mama que expressam RE+/RP+, correspondem a 80% dos casos ²¹ e são considerados o subtipo mais

responsivo a terapia com tamoxifeno e inibidores de aromatase, enquanto que pacientes HER2+ respondem melhor ao trastuzumab ou lapatinib.^{22, 23}

Sabidamente, o subtipo molecular triplo-negativo (ER-/PR-/HER2-) que corresponde a cerca de 15% dos cânceres de mama,²⁴ está relacionado com uma pior sobrevida global e menor sobrevida livre de doença, permanecendo como o subtipo de mais difícil tratamento.²⁵⁻²⁷

Apesar dos avanços significativos nesta área, a maioria dos tumores de mama desenvolvem resistência aos medicamentos utilizados. E como já enfatizado anteriormente, as metástases são responsáveis por cerca de 90 % das causas de morte relacionadas ao câncer de mama.²⁸ Portanto, o direcionamento de uma terapia alvo contra os fatores que promovem os processos de angiogênese, invasão e metástase, se faz necessário como uma tentativa de melhorar a eficácia do tratamento contra o câncer de mama.

Dentre os quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer de mama estão agentes alquilantes (cisplatina, carboplatina e ciclofosfamida), antraciclinas (doxorubicina, epirrubicina e idarrubicina), plantas alcalóides (paclitaxel, vinorelbina e vindesina), e inibidores da topoisomerase (irinotecano, etoposide, e Teniposido)²⁹ e mais recentemente as terapias alvo.

As terapias-alvo atualmente desenvolvidas e que já apresentam estudos no câncer de mama, são:

- **Inibidores de EGFR** (*Epidermal growth factor receptor*) que desempenham um papel fundamental na inibição da proliferação celular e crescimento dos tumores, como: lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, cetuximab e gefitinib.³⁰⁻³³

- **Inibidores de mTOR** (*Mamalian target of Rapamicin*): mTOR é uma proteína quinase serina-treonina que desempenha um papel chave nas vias de transdução de sinal que controlam o crescimento e sobrevivência celular.³⁴ São exemplos de alguns exemplos de inibidores: Temsirolimus e Everolimus.³⁵

- **Inibidores da Poly (ADP-Ribose) polimerase (PARP)**: PARP tem um papel importante no reparo da quebra de fita única de DNA de tal forma que a inibição

desta proteína por agentes sintéticos, foi proposta como uma nova terapia alvo para portadores de câncer de mama com mutações em *BRCA1*.³⁶ São alguns exemplos de inibidores: Iniparib, Veliparib e Olaparip.^{37,38}

- **Inibidores de VEGF:** especificamente para VEGF-A, estudos demonstraram que esta inibição pode acontecer por meio do uso do anticorpo monoclonal Bevacizumab em pacientes com câncer de mama resultando na inibição eficiente da angiogênese.³⁹

- **Inibidores de VEGFR:** há várias moléculas que atuam como inibidores destes receptores, e despertam, atualmente, grande interesse na terapia alvo do câncer de mama tais como: Sunitinib Malato, Sorafenib, Motesanib e Axitinib.⁴⁰⁻⁴³ Embora todas estas moléculas atuem como inibidores dos receptores VEGF, cada uma apresenta determinada especificidade pelos diferentes membros desta família. São exemplos: o Sunitinib é um inibidor oral de múltiplos alvos, incluindo VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 além de Fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFRs), receptor tirosina quinase (Kit), e o receptor de fator estimulante de colônia-1.^{29, 44} O Sorafenib é conhecido por bloquear múltiplos receptores tirosina kinases, como: VEGFR, PDGFR e a vias de sinalização Raf/ MEK /ERK.⁴⁵ O Motesanib também inibe múltiplos alvos como o VEGFR, PDGFR e Kit,⁴⁶ o Axitinib atua como inibidor seletivo de VEGFR1, VEGFR2, e VEGFR3 com propriedades anti-angiogênicas e anti-tumorais,⁴⁷ o cediranib (AZD2171, Recentin) é um potente inibidor de VEGFR, assim como outros receptores do tipo tirosina quinase como KIT e PDGFR-A.^{48, 49}

Em comum, estes fármacos carregam o crescente número de investigações clínicas sobre seu uso, isolado ou em combinação com outros fármacos, em pacientes com câncer de mama.

1.3 Cediranib e os avanços no tratamento do câncer

Em estudos clínicos de fase II, o Cediranib apresentou resultados promissores em glioblastoma, demonstrando um aumento da sobrevida livre de doença para 6 meses.⁵⁰ A eficácia do Cediranib é relacionada, em vários trabalhos, com a sua

capacidade anti-angiogênica e habilidade em normalizar a vasculatura tumoral e aliviar o edema em pacientes com gliomas.^{51,52}

Seguindo a linha dos inibidores de VEGFR 1, 2 e 3, o **Cediranib** (AZD2171) é um novo fármaco que apresenta potente atividade dose-dependente (**Figura 1**)⁴⁸ e que recentemente vem sendo apontado como um potente agente anti-angiogênico.

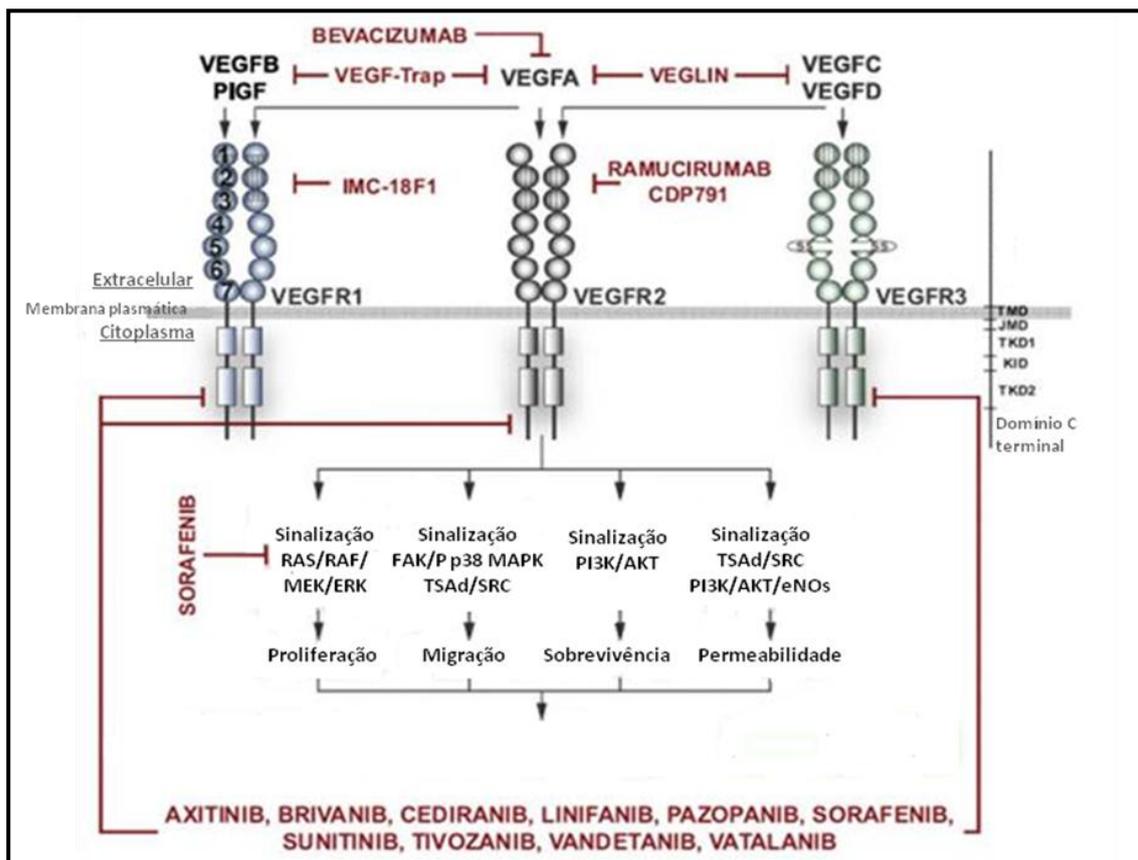


Figura 1 – Mecanismo de ação de terapias-alvo. O receptor VEGF é mostrado com seu domínio extracelular organizado em circuitos do tipo imunoglobulina (círculos, marcados de 1-7) e com o domínio intracelular de tirosina-quinase (quadrados). Cediranib atua como inibidor de receptores VEGF 1, 2 e 3. (Fonte: Adaptado de referência⁵³).

Estudos de Fase I e II demonstram evidências da atividade de Cediranib em pacientes com tumores sólidos avançados. Esses resultados são demonstrados quando

Cediranib é usado de forma exclusiva ou mesmo quando é usado em combinação com outros anti-neoplásicos.⁵⁴⁻⁵⁶ O uso do Cediranib, demonstrou efeitos positivos em tumores de pulmão⁵⁷⁻⁵⁹ e em pacientes com câncer de próstata metastáticos pré tratados com docetaxel e resistentes a castração.⁶⁰

No entanto, no tratamento do câncer de mama sua aplicação bem como seus potenciais benefícios é ainda um campo pouco explorado. Estudos em modelos animais apontam para os efeitos de inibição do Cediranib sob o crescimento de tumores sólidos humanos xenográficos (pulmão, cólon, próstata, mama e ovário) em camundongos atímicos, de forma dose-dependente. Nestes estudos observou-se que a administração crônica de 1,5 mg/kg/dia do fármaco, resultou em uma inibição estatisticamente significativa em todos os modelos xenográficos e esse amplo perfil de espectro antitumoral observado, foi associado com uma redução da vascularização tumoral.⁴⁸

Em um estudo recentemente publicado, utilizaram-se ratos xenográficos com diferentes modelos tumorais humanos (como: colo-retal, vulva, pulmão, mama, gliomas), tratados com cediranib combinado a outros quimioterápicos e apresentaram resposta positiva sobre a inibição do crescimento do tumor quando comparado ao grupo controle e em algumas situações, inclusive com redução do tamanho do tumor.⁶¹ Em especial, cabe ressaltar aqui que o modelo animal de câncer de mama humano triplo negativo (MX-I) ao receber cediranib combinado ao docetaxel, obteve resultado >100% de inibição de crescimento, ou seja, houve também redução do tamanho do tumor.

Adicionalmente, a administração oral de 5mg/kg/dia de Cediranib num modelo xenográfico de câncer de mama (MCF-7) apresentou efeito significativo, no período de 24 horas – 72 horas após a administração do fármaco, na redução da densidade de microvasos tumorais e no ki67, no entanto, esse efeito não foi sustentado durante o uso prolongado de cediranib. Após 4 semanas de administração crônica de cediranib, não houve diferença estatística na densidade de microvasos tumorais e ki67 em relação ao grupo controle.⁶²

Sabidamente diversos estímulos estão implicados no processo de metástase, mas a sinalização induzida por VEGF é considerado o fator crucial para este processo, visto que a expressão de VEGF é atribuída à capacidade de regular os processos essenciais ao longo da cascata angiogênica, incluindo a proliferação das células endoteliais e migração.^{63, 64} Apesar disso, apenas uma pequena fração de pacientes com câncer apresentam benefícios quando tratada com inibidores de VEGFR, uma vez que há mecanismos de resistência ou refratários que levam à continuação do crescimento tumoral.^{65, 66} Resultados contraditórios quanto ao uso dos inibidores de VEGFR levantam também questionamentos sobre a possibilidade do tratamento antiangiogênico desencadear tumores mais invasivos e metastáticos.^{62, 67, 68}

Considerando o potencial terapêutico do Cediranib para alguns tumores sólidos, existe uma grande expectativa por avanços científicos direcionado ao entendimento das bases genético-moleculares de resistência/sensibilidade ao tratamento do câncer de mama. Dentro deste contexto, vale ressaltar que recentemente uma nova classe de marcadores moleculares denominados microRNAs tem chamado muito atenção da comunidade científica por regularem a expressão de genes chaves envolvidos nos mecanismos de resposta ao tratamento com Trastuzumab.^{69, 70}

1.4 Regulação da expressão gênica por microRNAs e o câncer

Os microRNAs, ou miRNAs, são pequenos RNAs (19 a 24 nucleotídeos) não codificadores de proteínas, originados de RNAs precursores em grampo com cerca de 60 a 110 nucleotídeos envolvidos na regulação pós-transcricional de genes codificantes.⁷¹ Os miRNAs tornaram-se um ponto crucial na dissecação molecular do câncer humano há poucos anos atrás.⁷² MiRNAs maduros são resultantes de um processamento sequencial de transcritos primários (pri-miRNAs) mediado por duas enzimas ribonucleases III (RNase III), Drosha e Dicer. As formas maduras apresentam de 18 a 24 nucleotídeos e regulam negativamente a expressão protéica pelo pareamento com seu RNAm alvo, levando a inibição da tradução ou degradação do RNAm alvo.⁷²

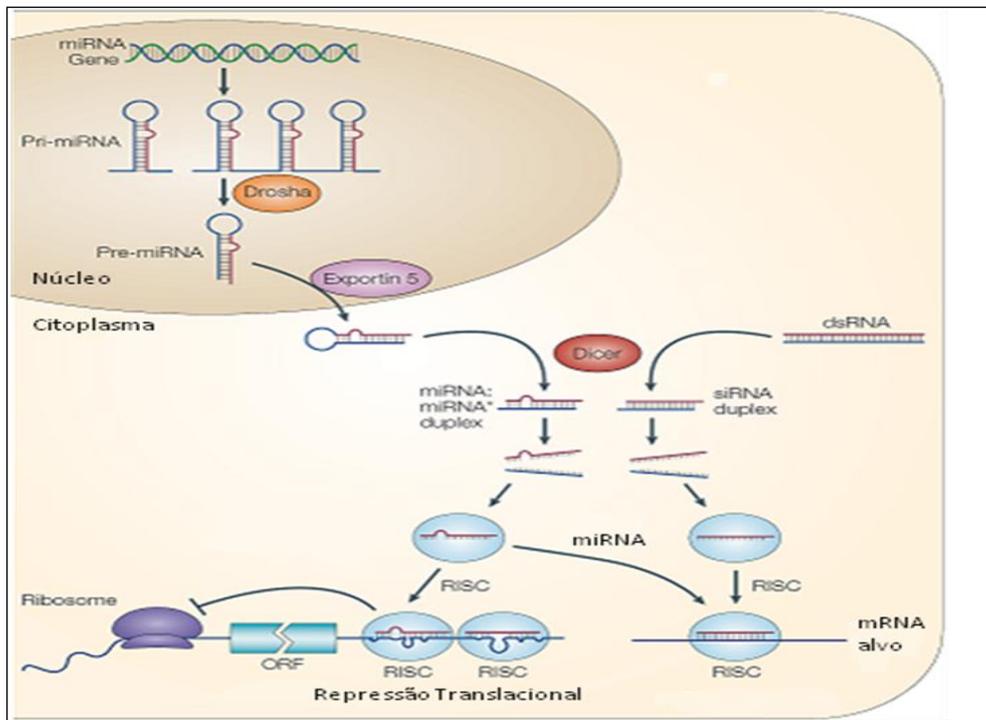


Figura 2 - Biogênese e mecanismo de regulação da expressão gênica dos microRNAs em células de mamíferos. (Fonte: Adaptado da referência ⁷²).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs ocorre por interação (pareamento de bases) na região 3' não traduzida dos RNAm (3'UTR) e depende do grau de complementaridade com o RNAm alvo. O resultado dessa interação pode levar à inibição da tradução ou à degradação do RNAm.⁷³ O pareamento imperfeito com o RNAm leva a inibição da tradução do RNAm alvo, sendo este o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos.⁷²

O fato dos miRNAs serem sequências pequenas e cujo mecanismo de ação independe do pareamento completo com seu mRNA alvo, faz com que um único miRNA possa regular muitos RNAm alvos, além de cooperarem no controle de um único RNAm.⁷⁴

Embora estejamos no início do entendimento da biologia dos miRNAs e seu modo de ação, o crescente número de estudos vem revelando a importância destes pequenos RNAs nos diversos processos biológicos. Além disso, através da regulação global da expressão gênica celular e a associação com diferentes funções, torna-se evidente que os miRNAs podem alterar a progressão de diversas patologias incluindo o câncer de mama.⁷⁴ Recentemente, foi proposto que a patogênese do câncer envolve, entre outras macromoléculas, os miRNAs, cujos perfis de expressão estão associados com o prognóstico e os resultados terapêuticos em vários cânceres humanos.⁷⁴

Além disso, os miRNAs desempenham um duplo papel na carcinogênese (oncomirs ou supressores tumorais) dependendo do padrão de expressão dos miRNAs nas células neoplásicas e dos alvos que são regulados por eles (**Figura 3**). Sendo assim, os miRNAs podem exercer função proliferativa e anti-apoptótica (oncomirs) promovendo a carcinogênese, quando estão superexpressos nas células neoplásicas. Por outro lado, podem exercer atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica funcionando como supressores tumorais se pouco expressos nas células neoplásicas, favorecendo assim a carcinogênese.⁷⁵

Embora a função dos miRNAs como oncogenes ou como supressores tumorais já tenha sido bem caracterizada, os mecanismos de mediação da angiogênese, invasão e metástase exercido pelos miRNAs foram abordados apenas recentemente.⁷⁶

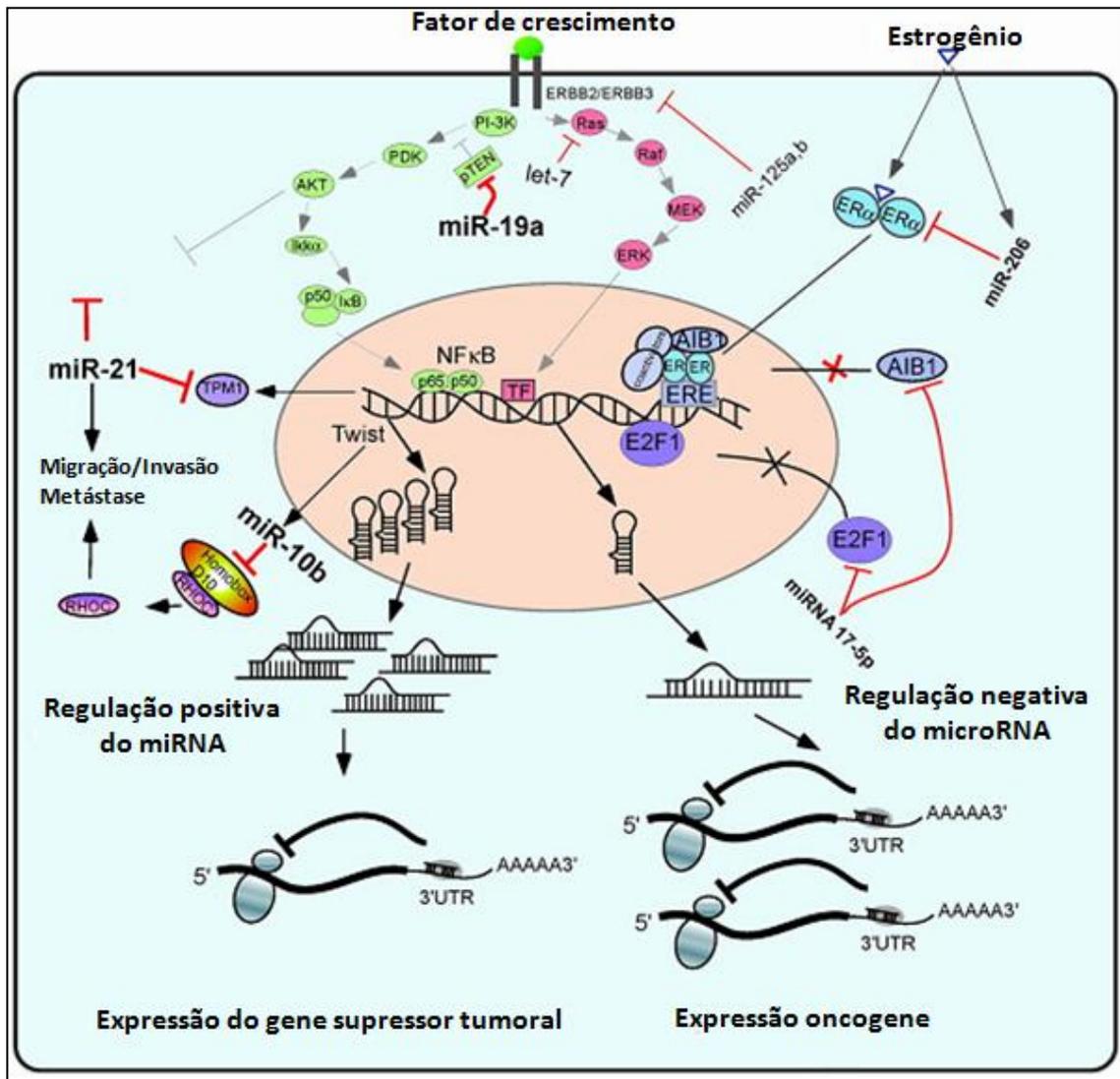


Figura 3 - Modelo do envolvimento dos miRNAs no câncer de mama pela modulação da expressão de genes supressores tumorais e oncogênicos. A baixa expressão pela deleção ou metilação de genes que codificam miRNAs resulta em um aumento da expressão de seus alvos. miR-10b e miR-21 superexpressos no câncer de mama regulam a expressão dos genes homeobox D10 e TPM1 respectivamente, resultando na invasão celular e metástase; miR-19a pode inibir o supressor tumoral PTEN e então ativar a via de sinalização celular PI3K/AKT; perda ou baixa expressão de let-7a e miR-125a,b, os quais inibem a expressão de Ras e ErbB2/3, respectivamente, dispara a ativação da via de sinalização celular Ras/Raf/Erk. Diminuição da expressão de miR-206

e miR17-5p simultaneamente ativa a via de sinalização RE (receptor estrógeno). (Fonte: Adaptado da referência ⁷⁸).

Um crescente número de estudos demonstram que os miRNAs desempenham importante papel no início, progressão e consequente invasão e metástase entre os diferentes tipos de cânceres.^{71, 78} O envolvimento dos miRNAs no processo de metástase tumoral está sob intensa investigação nos últimos anos e foi inicialmente descrito por Ma et al que encontraram o miR-10b como iniciador de invasão e metástase no câncer de mama.⁷⁶ Estes autores elucidaram o caminho molecular que liga miR-10b ao processo metastático, descobrindo que o gene Twist, um fator de transcrição promotor de metástase, poderia induzir a expressão de miR-10b que por sua vez inibe HOXD10, um fator de transcrição *homeobox* que atua como um repressor de genes envolvidos na migração de células e remodelação da matriz extracelular, incluindo RhoC, A3 integrina, metaloproteinase-14, e receptor ativador de plasminogênio tipo uroquinase.⁷⁹

O trabalho de Huang et al ⁸⁰ revelou que miR373 e miR520 também são miRNAs promotores de metástases. À semelhança do miR-10b, miR-373 e miR-520 não afetam a proliferação celular, mas promovem a migração e invasividade de células MCF-7 *in vitro*.

Células endoteliais cultivadas *in vitro*, também são alvo de estudos para identificar o perfil de expressão de microRNAs, a fim de conhecer microRNAs que podem contribuir para o processo de angiogênese.⁸¹⁻⁸³

Estudos recentes mostraram que miR-126 é um regulador positivo chave do processo de angiogênese em células endoteliais e de integridade vascular *in vivo*.⁸⁴⁻⁸⁶ Os autores demonstram que células endoteliais que não expressam miR-126 falham em responder a fatores angiogênicos, incluindo VEGF, fator de crescimento epidermal (EGF) e bFGF. Outro microRNA que promove a angiogênese em modelos de tumor *in vivo* é o miR-378, o qual aumenta a sobrevivência celular e promove angiogênese por ter

como alvos os supressores tumorais *Suppressor of fused homolog* (SuFu) e *tumor suppressor candidate 2* (TUSC2, também conhecido como Fus-1).⁸⁷

O fator angiogênico VEGF é altamente expresso em vários tipos de tumores e regula a jusante de uma ampla gama de estímulos tais como hipóxia, HIF, fatores de crescimento, citocinas e hormônios.⁸⁸ Recentemente, foi demonstrada que a regulação da expressão de VEGF também ocorre em nível pós-transcricional por ação de miRNAs pouco ativos em condições de hipóxia como miR-16, miR-15A, miR-15B, miR-20A e miR-20b que modulam os níveis de expressão de VEGF.⁸⁹ Em células humanas de câncer de próstata, a superexpressão de miR-21 está relacionada com o aumento da expressão de HIF-1 α e VEGF o que caracteriza uma indução de angiogênese tumoral.⁹⁰ Sendo assim, o controle da angiogênese tumoral exercida pelos microRNAs pode afetar a comunicação (*cross-talk*) entre as células tumorais e o endotélio vascular. Este é, portanto, um paradigma entre as células “normais”, tipos celulares não tumorais e endotélio, em vários processos fisiológicos e patológicos.

Tal como acontece com todos os trabalhos de descoberta, esses estudos tiveram consequências significativas. Demonstrou-se que a combinação do perfil de expressão completo seguido de estudos funcionais que envolveram a superexpressão e repressão de miRNAs representou uma abordagem mais significativa para a obtenção de grandes avanços dentro da pesquisa e respeito ao papel dos microRNAs nas doenças, incluindo neoplasias. A expressão anormal de miRNAs no tumor, caracterizada por níveis diferentes de expressão do miRNA maduro ou sequências de miRNA precursor, ou “miRNoma” (conjunto de miRNAs do genoma), em comparação com as células normais, tem provado ser uma anormalidade, nas células cancerosas.⁹¹

1.5 MicroRNAs como moduladores de resposta a fármacos anti-neoplásicos

Apesar dos progressos significativos na compreensão dos mecanismos moleculares que regem a complexa rede de sinalização celular do câncer a eficácia terapêutica ainda é muito deficiente em virtude da resistência a drogas e toxicidade induzida pela droga. A eficácia de agentes quimioterapêuticos é largamente

influenciada por acontecimentos celulares que interagem alterando os níveis de hormônios e receptores de fatores de crescimento que são, muitas vezes, alvos da terapia farmacológica e fatores determinantes da sensibilidade a drogas.⁹²

Estudos que evidenciam a associação de miRNAs na carcinogênese e metástase tumoral, adicionalmente, revelam que diversos miRNAs são identificados como moduladores da eficácia aos fármacos (**Figura 4**). Isto porque a alteração da expressão de microRNAs está dentre os mecanismos atualmente estudados de resistência a drogas nos pacientes com câncer.^{93, 94 95, 96}

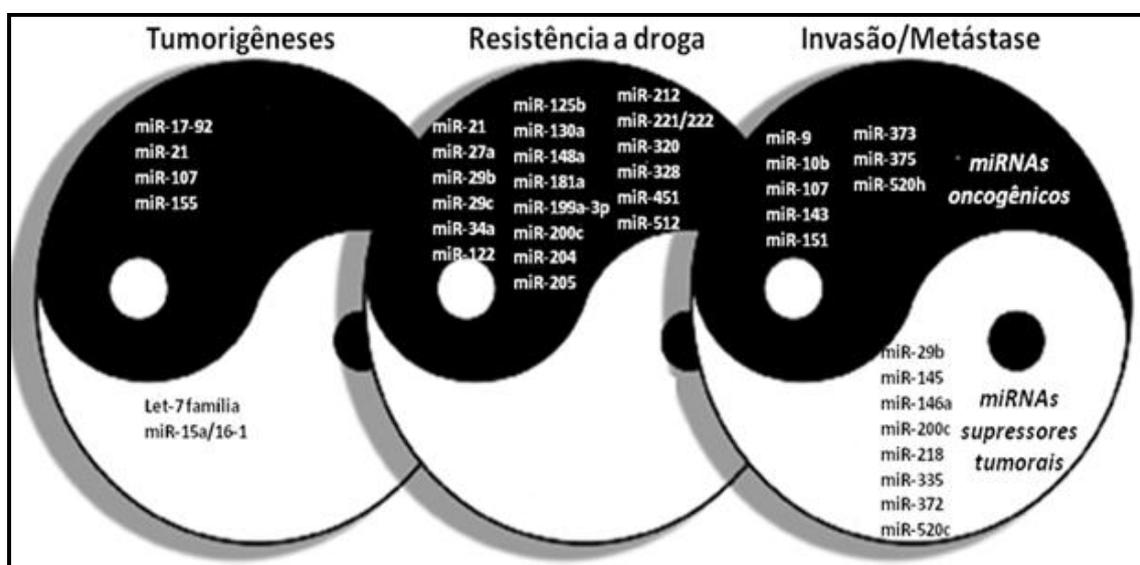


Figura 4 – MiRNAs funcionalmente envolvidos na progressão do câncer. MiRNAs com função caracterizada na tumorigênese, resistência a drogas e metástase. Oncogenes estão na área preta e supressores tumorais na área branca. (Fonte: Adaptado da referência ⁹⁷).

A resistência adquirida ao tratamento quimioterápico clássico sabidamente é um grande obstáculo no tratamento do câncer. A doxorrubicina é frequentemente utilizada na terapia do câncer da mama como agente único ou em combinação com outras drogas como o docetaxel e ciclofosfamida. Todas estas quimioterapias têm em comum que os mesmos são administrados sequencialmente, e muitas vezes resultam

em quimioresistência. Koop et al mimetizaram este modelo de terapia aplicada em pacientes com câncer de mama utilizando como modelo experimental a linhagem celular de carcinoma mamário humano BT474 tratada com doxorrubicina por vários ciclos. Os autores mostram que alterações na expressão de miR-200c sensibiliza células de carcinoma mamário ao tratamento com doxorrubicina.⁹⁸ Outros estudos utilizando linhagens celulares de carcinoma mamário humano como modelo já haviam sugerido que a perda da expressão de miR-200c pode regular a resistência a quimioterápicos, como paclitaxel e cisplatina.^{96,99} No entanto, o mecanismo exato pelo qual miR-200c induz esta quimioresistência ainda não foi elucidado.

Sendo assim novas abordagens são necessárias no que diz respeito ao tratamento do câncer. Evidências experimentais, *in vitro*, demonstram que alterações na expressão de determinados miRNAs estão associados a mecanismos de resistência a drogas em diferentes neoplasias e que a correção da expressão (superexpressão ou inibição) destes miRNAs, pode normalizar toda a rede de regulação pós-transcricional e sensibilizar as células a quimioterapia.¹⁰⁰ Um trabalho recente mostrou que a superexpressão ectópica de miR-34a foi capaz de sensibilizar células da linhagem celular de carcinoma mamário humano MCF-7, resistentes ao tratamento com adriamicina.¹⁰¹

Interessantemente, Ward et al desenvolveram um modelo de linhagem celular de carcinoma mamário MCF-7 que é resistente ao tratamento com tamoxifeno e em seguida, por meio de microarray, demonstraram que essa linhagem apresentou regulação negativa de miR-375. Através de ensaios subsequentes de transfecção de siRNAs foi recuperada a expressão de miR-375 e após essa indução as células tornaram-se sensíveis novamente ao tamoxifeno.¹⁰² Além disso, a superexpressão de MiR-210 na circulação de pacientes com câncer também foi associada com resistência ao tratamento com trastuzumab.⁷⁰

O mecanismo de ação do miRNAs é bastante amplo atuando em diferentes vias que influenciam na resistência a drogas, dentre as quais foi proposto, recentemente, que seriam capazes de regular pós-transcricionalmente muitos receptores nucleares de enzimas do citocromo P450.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Enzimas do citocromo P450, são responsáveis

pela detoxificação, modulação e ativação química metabólica de xenobióticos, entre eles, muitos fármacos e pró-carcinógenos.⁹⁵

Além disso, miRNAs específicos podem alterar a sensibilidade a agentes genotóxicos, como o miR-125b, que leva a redução da expressão p53.¹⁰⁶ Níveis elevados de expressão de miR-125b foram relacionados com a resistência de células neoplásicas de mama ao tratamento quimioterápico.¹⁰⁷ Num estudo realizado por Yamamoto et al foi utilizado a linhagem celular parental de carcinoma mamário humano, a MCF7, e também a linhagem com resistência a multidrogas, MCF7-ADR. Através de análise integrada de genes alvos, detectou-se que a expressão diferencial de miR-505 foi inversamente correlacionada com a expressão do gene Akt3 responsável pela modulação da sensibilidade à droga em MCF7-ADR.¹⁰⁸ Ainda em linhagens celulares estabelecidas de câncer de mama, a linhagem MCF-7, resistente a doxorrubicina, demonstrou, por exemplo, uma redução da expressão de miR-451 cujo alvo é a p-glicoproteína.⁹³ Esta glicoproteína é responsável pelo efluxo de drogas mediada pela via de transportadores ABC cassete dependente de ATP (trifosfato de adenosina).¹⁰⁹

Considerando o exposto, concebemos que a identificação dos perfis de expressão de miRNAs modulados em resposta à ação do fármaco Cediranib poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares que regem os processos de invasão e metástase tumoral no câncer de mama.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CIENTÍFICA

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 Justificativa

O câncer de mama é a principal causa de morte entre as mulheres. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares de resposta a quimioterápicos, a eficácia terapêutica ainda é foco de muitos estudos em virtude da resistência das células neoplásicas aos agentes quimioterápicos e a alta toxicidade.

Evidências indicam que os microRNAs regulam a expressão de genes importantes (regulação pós-transcricional) envolvidos nos mecanismos de tumorigênese e metástase. Sabe-se ainda que os tumores de mama apresentam padrões de expressão gênica alterado, e que diversos microRNAs são capazes de alterar a resposta a droga pelas células neoplásicas.

O Cediranib é um importante inibidor de VEGFR e tem apresentado resultados promissores no tratamento de alguns tumores sólidos. No entanto, no câncer de mama os seus efeitos ainda não foram explorados.

2.2 Hipótese

Considerando a importância dos miRNAs na regulação da expressão de genes envolvidos na tumorigênese e metástase tumoral, bem como nos mecanismos de resposta terapêutica, nossa hipótese é que a exposição de células de carcinoma mamário humano ao fármaco Cediranib leva à modulação de miRNAs, cujos padrões de expressão estão associados a mudanças no comportamento celular.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os potenciais mecanismos de ação do fármaco Cediranib, influenciados por microRNAs, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor.

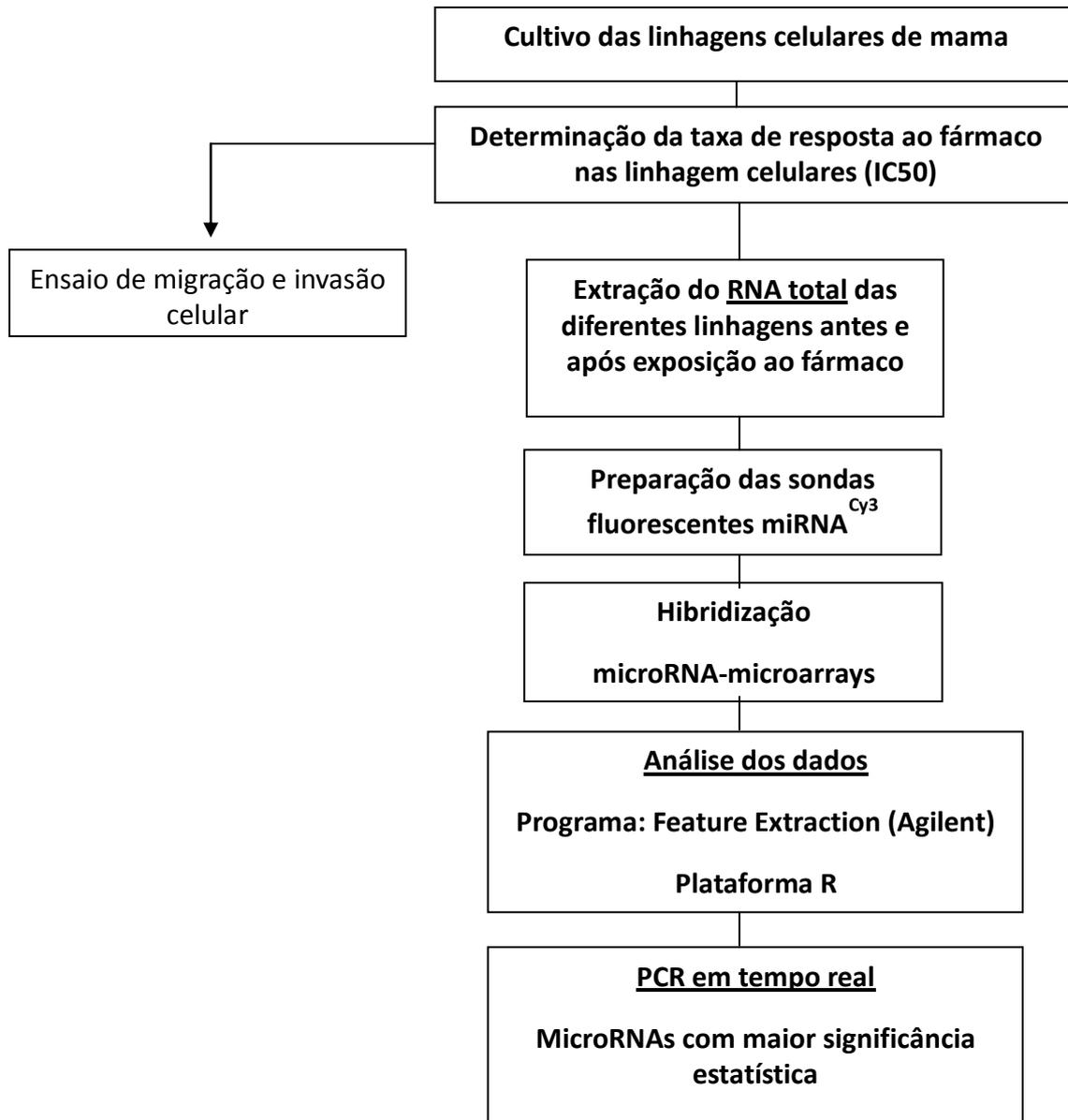
3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração máxima do fármaco Cediranib capaz de inibir metade da proliferação celular em linhagens de carcinoma mamário humano invasor.
2. Mensurar o impacto da exposição do Cediranib na capacidade de migração e invasão celular destas linhagens *in vitro*.
3. Avaliar e comparar os perfis de expressão diferencial dos miRNAs nas linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor, expostas ou não ao fármaco Cediranib, usando a tecnologia de microarrays.
4. Confirmar a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos por meio da técnica de PCR em tempo Real.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4 DELIANEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Fluxograma do trabalho



MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspecto Ético

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII, SP, Brasil (CEP) apenas para conhecimento da instituição citada, já que o estudo utiliza linhagens estabelecidas imortalizadas e dispensa autorização.

5.2 Linhagens Celulares

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares tumorigênicas de mama Hs578T, MDA-MB-231 e T47D, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rui Manuel Reis da Universidade do Minho, Portugal e atual coordenador do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos. A escolha das linhagens celulares foi determinada baseada nas características fenotípicas e genotípicas que as classificam em subtipos moleculares de câncer de mama de maior interesse para o estudo.

A **tabela 2** apresenta informações das características celulares que permite a classificação destas linhagens dentre os subtipos moleculares do câncer de mama baseada na expressão dos receptores hormonais (estrógeno (RE) e progesterona (RP)) e antígeno HER2. Os dados foram obtidos a partir da ATCC (*The Global Bioresource Center* <http://www.atcc.org/>). Os receptores hormonais tiveram autenticação confirmada por imunohistoquímica no laboratório de Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos¹¹⁰.

A descrição completa de todas as linhagens propostas para este estudo pode ser obtida consultando a ATCC (<http://www.atcc.org/>)

Tabela 2 - Características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama.

Linhagem	Tipo histológico	Receptores	Mutações	Subtipo Molecular
T47D	Ductal	RE+/RP+/HER2-	P53/PI3KCA	Luminal A
MDA-MB-231	Ductal	RE-/RP-/HER2-	CDKN2A;BRAF;KRA S;TP53;NF2	Triplo negativa
Hs578T	Ductal	RE-/RP-/HER2-	CDKN2A;PIKR1; HRAS;TP53	Triplo negativa

Todas as linhagens celulares deste estudo foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado. As células foram colocadas em frascos de cultivo com 25 cm² de área cultivável a uma temperatura de 37° C em uma atmosfera com 5% de CO₂ para obtenção de uma monocamada celular semiconfluente.

5.3 Ensaios para determinação da viabilidade celular (ensaios basais).

As linhagens estudadas apresentam características moleculares conhecidamente distintas, portanto, para identificar as condições ideais que permitem a viabilidade celular, foi necessário avaliar o comportamento das células quando exposta a diferentes variáveis de cultivo. Foram testadas 3 variáveis: densidade celular (4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 e 10000 células), tempo de cultivo (24, 48 e 72h) e concentrações de Soro fetal Bovino- SFB (0%, 0,5% e 1%). O efeito das variáveis testadas foi comparado a situação normal de cultivo com SFB a 10% e dispostas em porcentagem. Os resultados foram obtidos através do ensaio colorimétrico de proliferação celular MTS (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) (Promega, Madison, WI).

5.4 Determinação da concentração máxima capaz de inibir metade da proliferação (IC50) do Cediranib.

O ensaio de concentração máxima a 50% (IC50) visou determinar a quantidade de fármaco a ser aplicado em cada linhagem celular. Para isso, as células foram lavadas suavemente com 1 ml de PBS (Gibco, Invitrogen), tripsinizadas com 500 µl de tripsina (Gibco, Invitrogen) a 37 ° C por cerca de 5 minutos, em seguida inativada com 5 ml de meio DMEM (10% SFB -1% penicilina/streptomicina), recolhido o sobrenadante e centrifugado a 1000 rpm durante 5 min.

O *pellet* de células formado foi ressuspenso em meio fresco e 20 µl de suspensão celular foi coletada e homogeneizada com 20 µl de azul Trypan para contagem na câmara de Neubauer. A densidade celular foi, então, calculada para a distribuição respectivamente uniforme das células em placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por um novo meio (DMEM 0,5% de SFB inativado e 1% penicilina/streptomicina) contendo o fármaco Cediranib dissolvido em DMSO (respeitando o máximo de 1% de DMSO, constante em todas as doses) também conhecido como, AZD2171 (Selleck Biochemicals), previamente preparado em diferentes concentrações. AZD2171(C₂₅H₂₇FN₄O₃), comercialmente conhecido como Cediranib, sintetizado pela *Selleck Chemicals*, foi preparado em um estoque de 10 mmol/L de solução diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO), na qual foram utilizadas diluições intermediárias (0-60µM) para realização dos ensaios *in vitro*.

A atuação do fármaco foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de proliferação celular MTS (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) que produz um produto cuja máxima absorbância é de 490-500 nm em solução salina tamponada com fosfato. O MTS foi aplicado em intervalos de 24 horas até 72 horas. Para finalizar o ensaio, o meio de cultura contendo o fármaco foi substituído pelo DMEM (0,5% de SFB) com MTS numa concentração de 10%, após 2 horas de incubação, foi realizada a leitura do ensaio.

O cálculo de IC50 foi determinado utilizando o pacote *drc: Analysis of dose response curves* na plataforma R. (<http://cran.r-project.org/web/packages/drc/index.html>) O modelo de dose-resposta utilizado foi

determinado de acordo com o mínimo de divergência utilizando o critério estatístico de Informação de Akaike (AIC).

5.5 Ensaio de migração celular

Para realização do ensaio de migração, foi feito inicialmente no verso da placa dois traços paralelos, em seguida, foram semeadas 5×10^5 células/ml de cada linhagem celular em placas contendo 6 poços. Após atingirem a confluência total, foi removido o meio e as células foram lavadas com PBS (1x). Foi então aplicado um novo meio (0,5% SFB) contendo fármaco para tratamento (IC50 de 72h) ou DMSO (controle). Com o auxílio de uma ponteira de 100 μ l, foram feitas duas feridas transversais ao traço previamente delimitado em cada poço, as células foram incubadas a 37° C e as medidas foram documentadas, em intervalos previamente estabelecidos (0, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas), através de fotos realizadas em 4 pontos correspondentes na ferida localizados abaixo do traço delimitado de caneta, com uma câmera acoplada ao microscópio.

Os dados obtidos foram analisados no ambiente estatístico-matemático R em que a capacidade de migração celular foi mensurada em relação a exposição ou não ao fármaco. A distância relativa de migração foi calculada através da fórmula: distância relativa de migração (%) = $100 (A-B)/A$. Onde A é a largura da ferida antes da incubação, e B é a largura da ferida após a incubação. Os resultados foram demonstrados em média \pm desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi o teste T entre o controle vs. dose IC50 de Cediranib em 72h.

5.6 Ensaio de invasão celular

O ensaio de invasão Kit BD Biocoat™ Matrigel™ Invasion Chamber, possui uma camada fina de matrix de matrigel (8 μ m) que mimetiza a membrana basal, bloqueando células não invasivas de migrar através da membrana.

Para o ensaio a matrix de matrigel foi reidratada com 500 μ l meio de cultura (sem SFB) no interior do inserto e 500 μ l dentro do poço durante 2 horas a 37 ° C, em

atmosfera de 5% CO₂. Após a reidratação, o meio foi removido de ambos (inserto e poço), e foi colocado 500 ul de meio (0,5% SFB) com a suspensão celular 1×10^6 , contendo o fármaco (IC50) ou DMSO (controle) sobre o inserto. Em seguida, foi adicionado o DMEM (10% SFB) sob o inserto, com a finalidade de atuar como quimioatrativo (**Figura 5**).

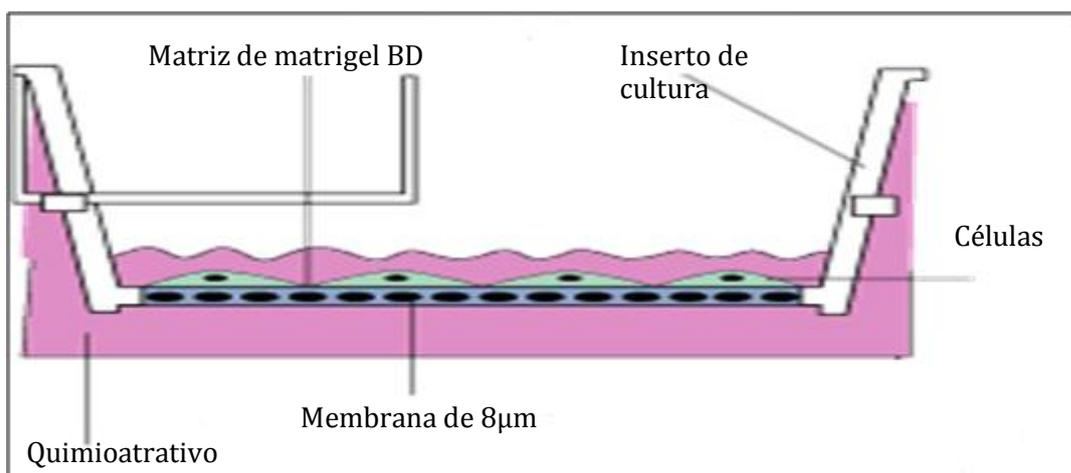


Figura 5 - Modelo do ensaio de invasão celular *in vitro*. As células em suspensão foram colocadas em meio (0,5% de SFB) sobre o inserto, em seguida, foi adicionado meio a 10% de SFB no poço para efeito quimioatrativo, após 22 horas as células invasoras foram quantificadas.

Após 22 horas, as células não-invasoras foram removidas a partir da superfície superior da membrana com um cotonete e as células invasoras localizadas na superfície inferior da membrana foram fixadas com metanol frio (2 minutos) e coradas com hematoxilina de 100% (1 min), seguido de lavagem em água, 5 vezes. Em seguida, as células foram também coradas com eosina (1min) e lavadas em água 5x para eliminar excessos de corantes.

As membranas ficaram expostas a temperatura ambiente até a completa secagem. Após secas, foram retiradas dos poços com o auxílio de um bisturi e organizadas em lâminas com aproximadamente 20ul de glicerol para fixação da

lamínula. As células invasoras da matrix de matrigel foram então fotografadas em um sistema de câmara Olympus DP70 digital e contadas através do software Image J (versão 1.41, NIH). O cálculo do percentual de invasão celular foi feito através da normalização para a condição de controle. Os resultados são a média de duas experiências independentes.

5.7 Extração e quantificação do RNA total das linhagens celulares

Para a extração de RNA total, cerca de 5×10^4 das células Hs578T, MDA-MB-231 e T47D foram semeadas e cultivadas até atingirem a sub-confluência (80% de confluência). As células foram inicialmente lavadas (2x) com PBS 1X. Em seguida a extração de RNA foi feita seguindo o protocolo do kit miReasy (Qiagen). Foi adicionado 1 ml de Qiazol e agitado manualmente por 15 minutos. Em seguida, com o auxílio da pipeta o trizol foi novamente homogeneizado e o sobrenadante foi transferido para um tubo que foi conservado a -20°C , até o momento do uso. Adicionou-se 200 μl de solução salina e 200 μl de clorofórmio, agitou-se novamente invertendo o tubo cerca de 30 vezes, foi centrifugado a 12000 xg a 4°C por 15 minutos para que pudessemos lisar e liberar a fase aquosa (RNA), que foi colocado num tubo falcon e imediatamente imerso no gelo. Foi então adicionado 1 $\frac{1}{2}$ volume de etanol 100%.

Em seguida realizou-se a purificação do material em colunas com filtros de sílica fornecidas pelo kit que retém o RNA total e o material filtrado é descartado. Na sequência, foram realizadas duas etapas de lavagem. Inicialmente adicionou-se 700 μL da solução *Wash 1* (fornecida pelo kit) e então fez-se a centrifugação das amostras por 30 segundos a 10.000 rpm e temperatura ambiente. Desprezou-se o filtrado e na mesma coluna de purificação e adicionou-se 500 μL da solução *Wash 2* (também fornecida pelo kit).

As amostras foram então novamente submetidas à centrifugação por 30 segundos a 10.000 rpm à temperatura ambiente, a fim de eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação. Realizamos nova centrifugação. Na sequência, foi feito um tratamento com o mix de DNase, um

preparado contendo: 3 μ L da enzima DNase (Life Technologies), 3 μ L de 10X DNA buffer e 30 μ L de água nuclease *free*. Foram então adicionados a cada amostra, 60 μ L deste mix no centro da coluna, seguida de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, repetiu-se o processo de lavagem em que foram realizados novamente duas etapas de lavagem. A saber: inicialmente adicionou-se 350 μ L da solução *Wash 1* e então fez-se a centrifugação das amostras por 30 segundos a 10.000 rpm à temperatura ambiente. Desprezou-se o filtrado e em seguida na mesma coluna de purificação, adicionou-se 500 μ L da solução *Wash 2*.

As amostras foram resubmetidas a centrifugação por 30 segundos, a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O filtro foi então transferido para um novo tubo coletor fornecido pelo kit e 20 μ L de água RNase *free* foram adicionados no centro do filtro. Após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação durante 1 minuto em temperatura ambiente a fim de obter o RNA total eluído em água RNase *free*. O RNA total obtido foi então armazenado em freezer -80°C até sua utilização.

5.7.1 Avaliação da quantidade e qualidade do RNA total

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho *NanoDrop ND-2000* espectrofotômetro (*NanoDrop Products*, Wilmington, DE, USA) sendo que 1U A_{260} corresponde a 40 μ g de RNA/mL. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes ($A_{260}/A_{230} \sim 1,8$) e de proteínas ($A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$).

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluidica (*On-Chip electrophoresis*) utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100* Agilent (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) e com os RNA *Nano Chips* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) (**Figura 6**).

Antes de iniciar o preparo do gel para eletroforese, todos os reagentes que até o momento estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. Para limpeza dos eletrodos, aplicou-se cerca de 400 μ L de RNaseZap (Life Technologies), seguido de água no cartucho de lavagem e o mesmo foi inserido no

aparelho com a tampa abaixada por 1 minuto. Em seguida, o cartucho foi retirado e a tampa aberta para secagem dos eletrodos durante a preparação do chip.

Decorrido o tempo de 30 minutos de descongelamento dos reagentes, iniciou-se o preparo do gel, em que adicionou-se 650 μ L do RNA Nano gel numa coluna com filtro fornecida pelo próprio kit e centrifugou-se a 10.000g, durante 15 minutos em temperatura ambiente. O gel foi aliquoteado em tubos de 0,2mL com 45 μ L cada e armazenados a -30 ° C até o momento de uso. Em uma alíquota de 45 μ L em um tubo 0,2 μ L livre de nuclease, foi adicionado 2 μ L de RNA 6000 *Nano Dye*, levou-se ao vórtex por 10 segundos e depois centrifugou-se a 13.000g por 10 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 *Nano chip* que foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos para leitura de RNAs. Primeiramente adicionou-se 9 μ L da mistura do gel/dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o chip. Em seguida, adicionaram-se outros 9 μ L da mistura nos demais pontos indicados com a letra G. Adicionou-se 9 μ L da Nano RNA *conditioning solution* na posição marcada como CS, o 1 μ L de marcador na posição indicada como *ladder* e 5 μ L de *RNA Nano Marker* em cada uma das 11 amostras, bem como na posição do marcador. Por último, as amostras foram denaturadas a 70°C por 2 minutos, para evitar formação de estruturas secundárias e adicionou-se 1 μ L de cada amostra nos respectivos poços marcados de 1 a 11. Com a ajuda do vórtex IKA MS3 (Manca, Hong Kong, CHIN), agitou-se o chip horizontalmente a 2.200 rpm por 1 minuto e em seguida, colocou-se o chip no bioanalisador. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroferograma e densitometria dos géis) em 30 minutos de corrida eletroforética. A **Figura 6** mostra o fluxo de trabalho para preparação dos chips e posterior análise da eletroforese microfluidica no *Bioanalyzer*.



Figura 6 – Fluxograma para preparação dos RNA *Nano Chip*. Utilização do equipamento *Bioanalyzer* 2100 Agilent, para avaliação da qualidade das amostras de RNA total.

5.8 MicroRNAs *microarrays*

Para avaliar o perfil de microRNAs das linhagens tumorigênicas do estudo, foram utilizadas lâminas de microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo cada uma, quatro regiões com 15.000 oligos (60 mer) representando 886 miRNAs humanos e 89 virais pelo processo de SurePrint (sistema de impressão), formato denominado de 8x15k oligo-*arrays* (**figura 7**). Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, de 40-60-mer de comprimento (o que inclui a sequência de miRNA e uma cauda extra), com extrema

precisão resultando em alta pureza e alta fidelidade das sondas de microRNAs.

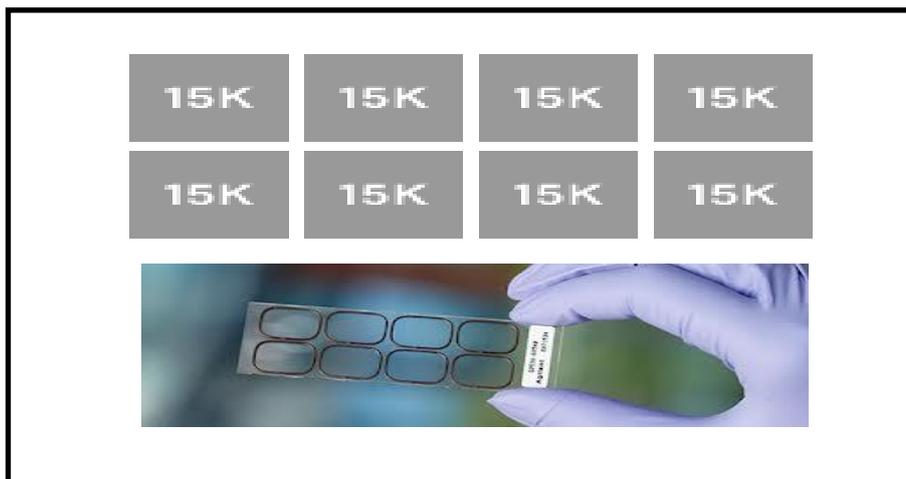


Figura 7 – MicroRNA Microarrays (Agilent). O formato 8x15K contém oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências de microRNAs.

A marcação das amostras foi feita em triplicatas, sendo as mesmas controle verso tratamento com Cediranib nas três linhagens (Hs578T, MDA-MB-231, T47D), totalizando 18 marcações, utilizando o *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)* a partir de 200ng de RNA total. O primeiro passo envolveu a diluição do RNA total para 100ng/ μ L em água livre de nucleases. Posteriormente, adicionou-se 2 μ L (200ng) dessa diluição em um tubo de 0,6mL e conservou-se no gelo enquanto foi preparado o CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) Master Mix, que foi feito sem a marcação do *Spike-in*. A reação por amostra do CIP Master Mix continha: 0,4 μ L de 10X *Calf Intestinal Phosphatase Buffer*; 1,1 μ L de água livre de nucleases e 0,5 μ L de *Calf Intestinal Phosphatase*, sendo o volume final em cada amostra de 4 μ L.

O passo seguinte envolveu a defosforilação das amostras. Todos os tubos foram colocados a 37°C em um termociclador por 30 minutos. Em seguida, desnaturaram-se as amostras adicionando, em cada uma delas, 2,8 μ L de DMSO 100% por 8 minutos. Após esse tempo, os tubos foram colocados imediatamente em um banho frio feito de uma mistura de água e gelo.

Após a denaturação, partiu-se para o processo de ligação preparando-se o *Ligation Master Mix*. Nesse mix utilizou-se por amostra: 1µL de 10X T4 RNA Ligase Buffer (aquecido previamente a 37°C para dissolução do precipitado); 3µL de Cyanine3-pCp e 0,5µL de T4 RNA Ligase. Após a adição do mix, misturou-se gentilmente, resultando num volume final de 11,3µL, e uma baixa e rápida centrifugação foi feita antes que os tubos fossem levados para incubação a 16°C em um termociclador por 2 horas.

Decorrido o tempo da incubação, foi adicionado 38,7µl de água às amostras, para purificação usando as colunas *Micro Bio-Spin 6 Chromatography Columns* (Bio-Rad). As colunas foram devidamente preparadas seguindo as recomendações do fabricante e todo o conteúdo (volume total de 50µl) foi depositado na superfície das mesmas e centrifugado a 1000 g por 4 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a secagem a vácuo, à temperatura de 45°C num aparelho Savant ISS110 *Speedvac Concentrator* (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) por aproximadamente 60 minutos observando-se que estivessem totalmente secas e sem resíduos de DMSO.

Na etapa que antecede a hibridação, as amostras foram ressuspensas em 18µL de água livre de nucleases e em seguida, pipetou-se 4,5µL de 10X *Blocking Agent* (preparado com a adição de 125µL de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos) e 22,5µL de 2X *Hi-RPM Hybridization Buffer*, resultando num volume de 45µL. Após serem misturadas gentilmente, as amostras foram incubadas a 100°C, por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo, por 5 minutos. Enquanto ocorria a incubação, as câmaras de hibridação contendo as lâminas da Agilent foram preparadas para receber as amostras. Tudo ocorreu num período máximo de 15 minutos. O processo de hibridação com os *microarrays* aconteceu num forno a 55°C com 20rpm durante 20 horas.

Após a hibridação, as lâminas foram submetidas a imersão em *GE Wash Buffer 1* (com 0,005% Triton X-102), à temperatura ambiente, para a liberação da lâmina em meio líquido, evitando o ressecamento e exposição ao ozônio do ar capaz de degradar a cianina (Cyanine3-pCp).

Em seguida, foram realizadas duas lavagens: a primeira no tampão 1 (*GE Wash Buffer 1* 0,005% Triton X-102) à temperatura ambiente por 5 minutos e a segunda no tampão 2 (*GE Wash Buffer 2* 0,005% Triton X-102) por 5 minutos, a 37°C. A adição do Triton reduz a possibilidade de artefatos nos *arrays*.

Após serem retiradas da solução, as lâminas foram varridas imediatamente (*scanning*), evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais utilizando o DNA *Microarray Scanner* (*Agilent Technologies*).

5.8.1 Análise dos dados de *microarrays*

- Quantificação e pré-processamento dos dados de *microarrays* de microRNAs

Após o escaneamento das lâminas os dados brutos foram quantificados com o auxílio do software *Feature Extraction* versão.11.0 e os arquivos gerados foram submetidos ao ambiente matemático-estatístico R versão 2.11.0 (<http://www.r-project.org>) para as etapas de pré-processamento e análises subsequentes. O ambiente R funciona através de pacotes, que são instalados para realização de cálculos e funções matemáticas, a fim de realizar ou combinar testes estatísticos.

Na primeira etapa foi feito o ajuste de *background* pela subtração dos valores de *background* de cada microRNA (*gBGMedianSignal*) pelos valores de expressão (*gMedianSignal*), e transformados em escala logarítmica (\log_2). Finalmente, todas as distribuições foram normalizadas pelo método quantile, utilizando o pacote *Aroma light*.¹¹¹

- Análise Estatística por *Rank Products*

Os miRNAs diferencialmente expressos foram identificados pelo teste *Rank Products*, com uso do pacote RankProd em R.¹¹² *Rank Products* é um método estatístico não-paramétrico que fornece uma lista ranqueada por *fold change* em que é calculada a taxa de falsos positivos. Em um estudo recente, comparando diversos

métodos de análise de *microarrays*, esse teste foi considerado como um dos mais robustos, mesmo com baixo número de amostras.¹¹³

Os miRNAs foram considerados como diferencialmente expressos entre cada linhagem com fármaco comparando o perfil de expressão nas linhagens não tratadas correspondente de acordo com os parâmetros de *p-value* e *false-positive predictions* abaixo de 0.05.

-Agrupamento hierárquico e Diagrama de Venn

O resultado dos miRNAs diferencialmente expressos identificados pela análise estatística Rank Products foi representado em formato de Heatmaps. Foi calculado o valor da mediana dos miRNAs que apresentaram mais de uma *probe* diferencialmente expressa. Para a construção dos dendrogramas, foi utilizada a função *hclust* em R com distância de Pearson e *average linkage* para avaliação de similaridade entre miRNAs e amostras. Foi construído um *heatmap* para cada análise (controle vs. tratamento com Cediranib em cada linhagem celular) visando a identificação de miRNAs específicos e comuns em cada análise, foi construído um diagrama de Venn. Todas as figuras foram feitas com auxílio do pacote *gplots* em R.

- Predição de alvos dos miRNAs diferencialmente expressos

Os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos foram identificados por busca computacional bioinformática, utilizando-se 12 algoritmos de predição, entre eles, DIANA-microT, microCosm (miRBase), microRNA.org (miRanda), picTar-4-way, picTar-5-way, PITA All Targets, PITA Top Targets, RNA22 3'UTR predictions, RNA22 5'UTR predictions, RNA22 Coding Region Predictions, TargetScan Conserved Targets TargetScan Non-conserved Targets. O critério de seleção foi a presença em pelo menos 3 algoritmos. Todas as análises foram realizadas na plataforma miRDip (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/search.jsp#r>). Finalmente, a busca de funções dos alvos preditos foi feita pelo banco de dados DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), com *P-value* (corrigido por Benjamini) <0.05. Foram separados alvos de miRNAs

induzidos e reprimidos nessa análise. No DAVID, é possível selecionar as categorias significativas de interesse, assim, foram selecionados processos biológicos do *Gene Ontology* (GO) nível 2. A compilação das categorias foi feita utilizando-se o programa REVIGO e o pacote treemap no R.

5.9 Confirmação dos miRNAs diferencialmente expressos por PCR em tempo real (qRT-PCR).

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada para a confirmação dos dados de *microarray* para sete miRNAs, que se apresentaram diferencialmente expressos entre as linhagens celulares. Entre os miRNAs selecionados estão aqueles compartilhados entre as 3 linhagens, o hsa-miR-494 e o hsa-miR-923_V12.0. Além disso, miRNAs cuja assinatura de expressão foi específica da linhagem, também foram selecionados, como o hsa-miR-886-3p para MDA-231 e os hsa-miR-449a e hsa-miR-449b para a linhagem T47D.

Para normalização dos dados utilizou-se o RNU 44 e 48 como miRNA endógeno (cuja expressão se mantém com o mesmo padrão em todas as amostras biológicas). A seleção do melhor endógeno foi feita utilizando-se o programa Normfinder.

A reação de qRT-PCR foi feita utilizando-se o kit *Taqman microRNA Assays* (Life Technologies, Foster City, CA, USA), conforme orientação do fabricante. A quantificação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos, segue um protocolo simples, de dois passos, que requer a transcrição reversa com um primer microRNA específico seguido por PCR tempo real com sondas TaqMan. As reações de transcrição reversa foram realizadas com 10ng de RNA total, 0,15µL de dNTP; 1µL de enzima *Multiscribe*; 1,5µL de *10x RT buffer*; 0,19µL de *Rnase inhibitor*; 3µL do primer do microRNA de interesse; 4,16µL de água *RNAse free*, segundo as instruções do fabricante. As amostras permaneceram a 16°C, durante 30 minutos (1 ciclo), depois a 42°C (1 ciclo), durante mais 30 minutos e então a 85°C, durante 5 minutos (1 ciclo). As reações foram realizadas no termociclador *MasterCycle-Eppendorf*. Finalizada esta etapa, as amostras foram imediatamente colocadas no gelo e armazenadas a -20°C. A

segunda etapa consiste na reação de amplificação dos cDNAs. Para tal, adicionou-se a cada amostra 5 μ L de *master mix* RT; 2,5 μ L de água RNase free; e 0,5 μ L da sonda do mesmo miRNA que se utilizou o primer no processo de transcrição reversa da etapa 1. A quantidade do mix é determinada a partir da multiplicação pelo número de amostras, geralmente uma placa de 96 poços; adiciona-se 8 μ L do mix em cada poço; e 2 μ L do cDNA de cada amostra. As reações de qRT-PCR foram realizadas com o auxílio do aparelho 7900 HT *Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems USA)*. A reação tem volume final de 10 μ L, sendo que cada amostra foi feita em triplicata, com amplificação no 7900HT *Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems USA)* numa corrida de cerca de 2 horas e 30 minutos com os seguintes ciclos: Estágio 1, 10 minutos a 95°C; Estágio 2, 40 repetições de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

5.10 Análise dos dados de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

A expressão relativa de cada microRNA foi calculada pela análise comparativa do gene alvo com o do controle interno (RNU 44 e RNU 48 *Control miRNA Assay, Applied Biosystems, USA*), utilizando o método comparativo de $\Delta\Delta CT$, no programa R, como normalizador, utilizamos o valor mínimo de expressão do grupo não tratado em relação ao tratamento para cada linhagem.

A diferença estatística dos miRNAs entre as linhagens foi calculada usando o teste não paramétrico Mean-Whitney-U-test. Utilizamos como valor de corte o p valor $\leq 0,05$.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da viabilidade celular (ensaios basais) e determinação da concentração máxima de Cediranib capaz de inibir 50% da proliferação (IC50).

O crescimento celular *in vitro* das linhagens celulares de carcinoma mamário foi avaliado pela determinação de três parâmetros: variação do número de células (representado pelos blocos), de porcentagem de soro fetal bovino (SFB) (representado pelos sub-blocos) e tempo (24h, 48h e 72h estão indicados por cores na legenda). O eixo y representa o percentual de células viáveis em relação à condição padrão de cultivo.

Buscou-se a identificação da condição teste que mais se aproximasse de 100%, sendo superior ao mesmo, ou seja, que representasse a condição mais próxima da condição normal de cultivo para a aplicação do fármaco em 24h. Além disso, verificou-se se ao tempo de 72h (final de exposição, as células permaneciam com uma viabilidade acima de 100%).

A **Figura 8** representa os resultados obtidos com os testes nos ensaios basais para a linhagem celular tumorigênica Hs578T. Podemos observar que, para esta linhagem foi possível determinar, como condições ideais de cultivo para os testes de IC50, a quantidade de **4.000 células**, cultivadas por **24hs** e com **0,5% de SFB**, porque esta é a condição mínima onde já é possível observar viabilidade acima de 100%.

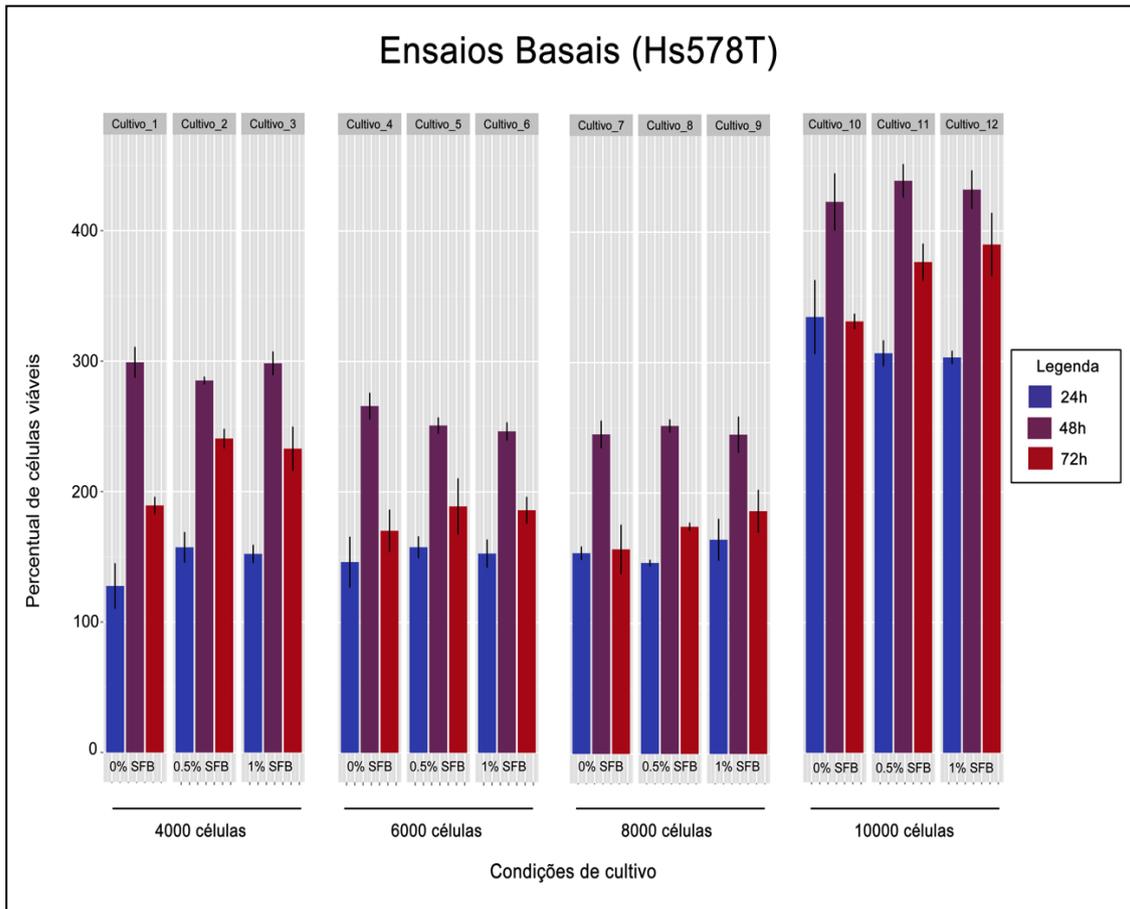


Figura 8 – Percentual de células viáveis, obtido a partir dos ensaios basais realizados na linhagem Hs578T.

A linhagem tumorigênica MDA-MB-231, a **Figura 9** mostra os resultados obtidos com os testes nos ensaios basais em que foi possível determinar, como condições ideais de cultivo para os testes de IC50, a quantidade de **6.000 células**, cultivadas por **24hs** e com **0,5% de SFB**, porque nesta condição mínima já é possível observar viabilidade acima de 100%.

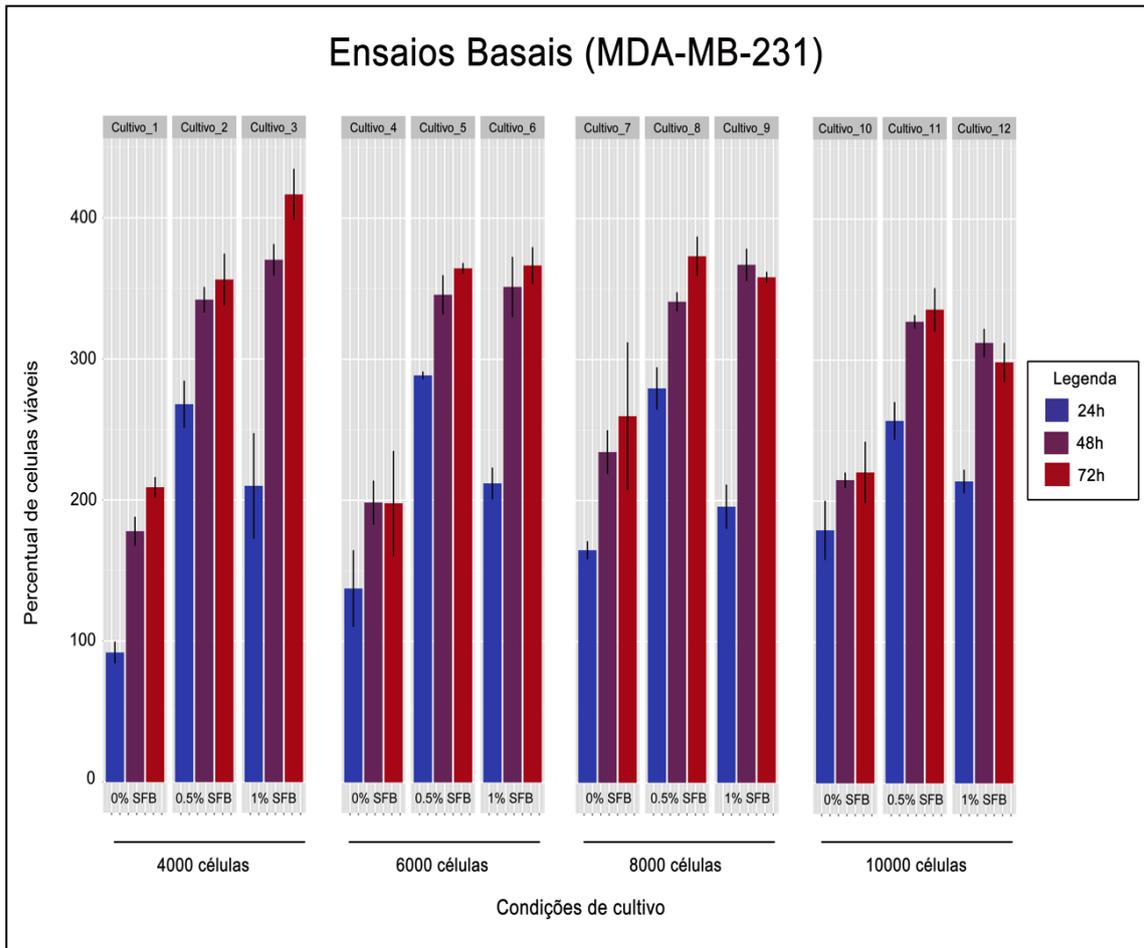


Figura 9 - Percentual de células viáveis, obtido a partir dos ensaios basais realizados na linhagem MDA-MB-231.

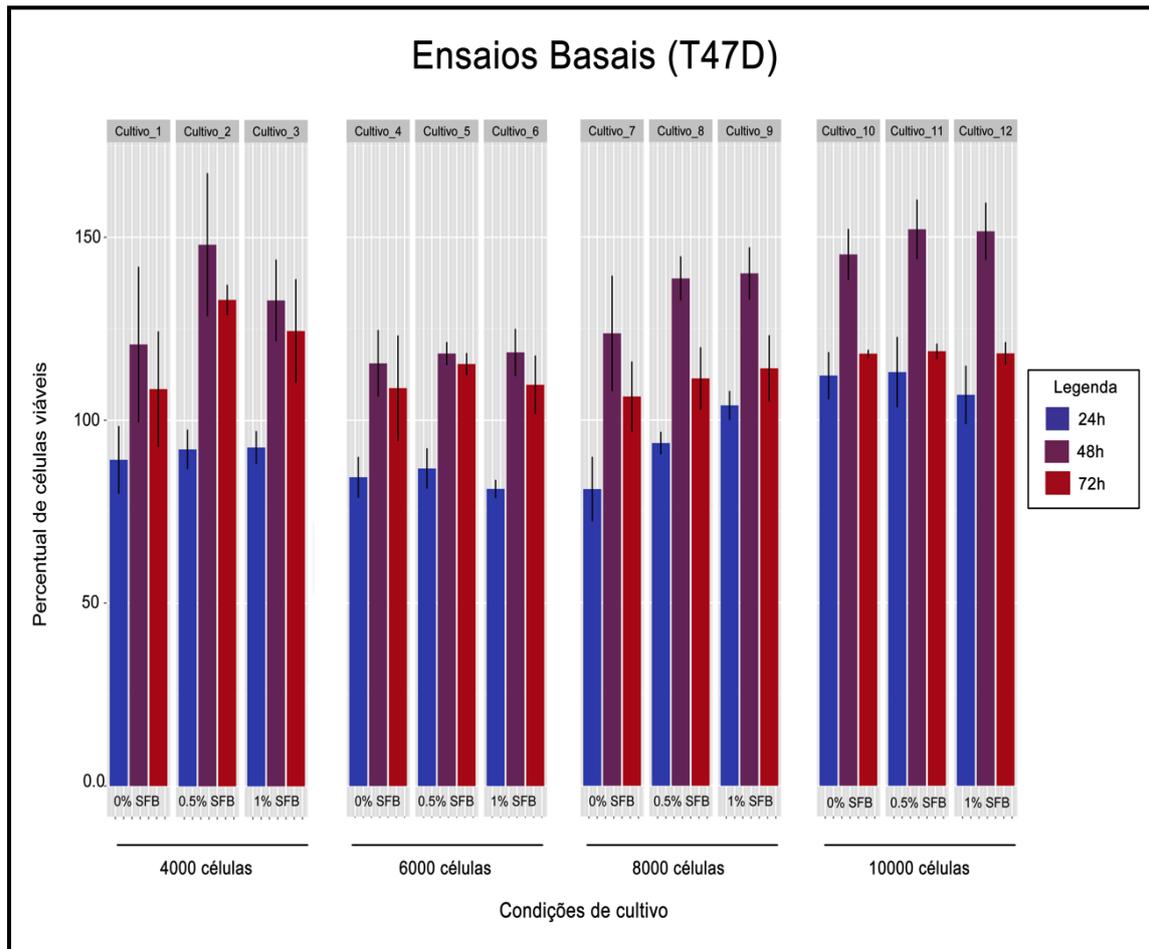


Figura 10 – Percentual de células viáveis, obtido a partir dos ensaios basais realizados na linhagem T47D.

E, finalmente, em relação a linhagem tumorigênica T47D, a **Figura 10** representa os resultados obtidos com os testes nos ensaios basais em que foi possível determinar, como condições ideais de cultivo para os testes de IC50, a quantidade de **10.000 células**, cultivadas por **24hs** e com **0,5% de SFB**, porque esta foi a condição mínima em que observou-se a viabilidade acima de 100%.

A partir dos ensaios basais, foi possível conhecer o comportamento das linhagens celulares para este estudo e, então, determinar a capacidade de resposta das linhagens de carcinoma mamário humano ao Cediranib por meio da determinação do IC50. O IC50 foi determinado nos três tipos celulares estudados (Hs578T, MDA-231

e T47D) nos tempos 24h, 48h e 72h, conforme mostrado na **Figura 11**. Os valores estão representados na escala \log_2 .

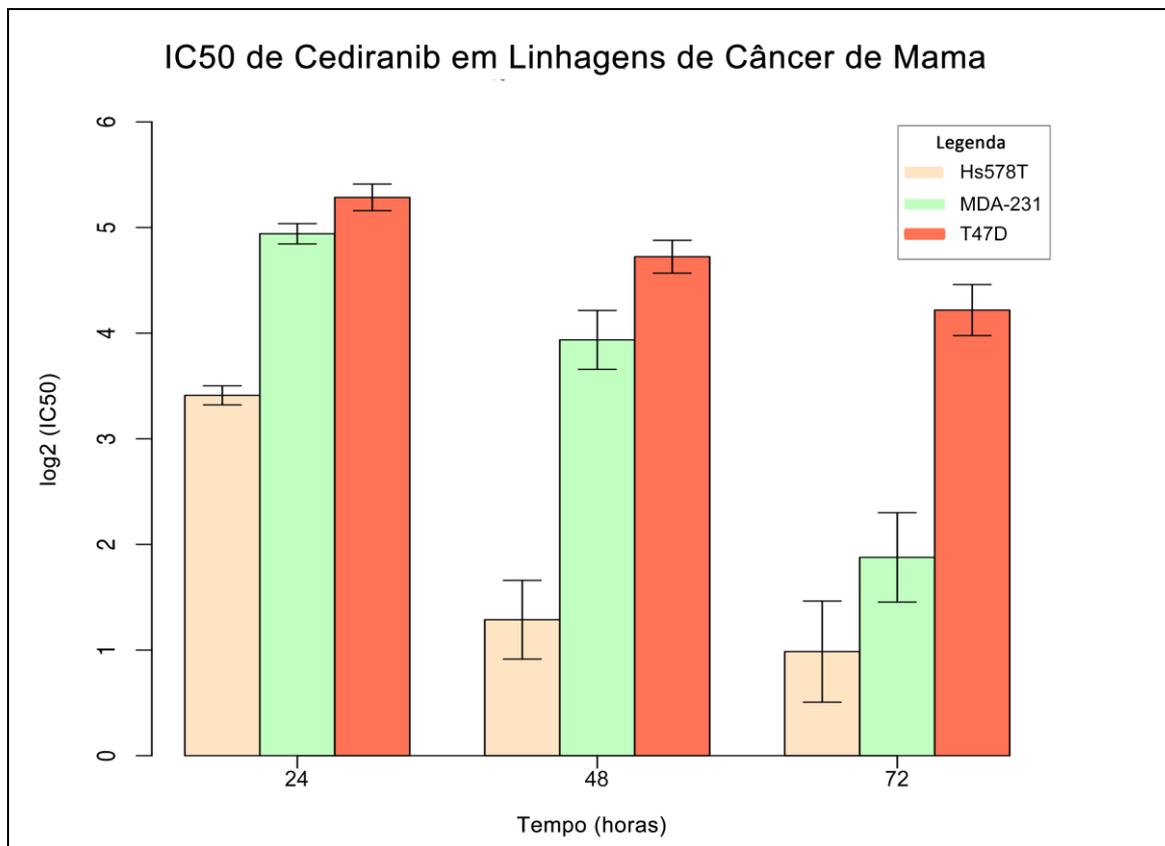


Figura 11 - Representação gráfica dos valores calculados de IC50 em escala \log_2 para as linhagens celulares de carcinoma mamário humano Hs578T, MDA-MB-231 e T47D.

Os valores de IC50 obtidos para cada linhagem de carcinoma invasor de mama após exposição *in vitro* ao fármaco Cediranib estão listados na **tabela 3** evidenciando os valores obtidos nos diferentes tempos.

Tabela 3 - IC50 do Cediranib em linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor (valores em μM).

Linhagens Celulares	Média IC50 (μM) \pm DP		
	24h	48h	72h
Hs578T	10,66 \pm 0,66	2,51 \pm 0,62	2,08 \pm 0,77

MDA-MB-231	30,77±2,01	15,57±3,03	2,52 ± 0,81
T47D	38,69±2,90	26,54±2,79	18,85 ± 3,21

6.2 Avaliação da capacidade de migração celular *in vitro* das linhagens tumorigênicas expostas ao Cediranib.

A **Figura 12** permite a visualização da capacidade de migração celular *in vitro* das linhagens celulares de carcinoma mamário Hs578T, MDA-MB-231 e T47D expostas a ação do Cediranib em comparação com as linhagens controles (sem o Cediranib).

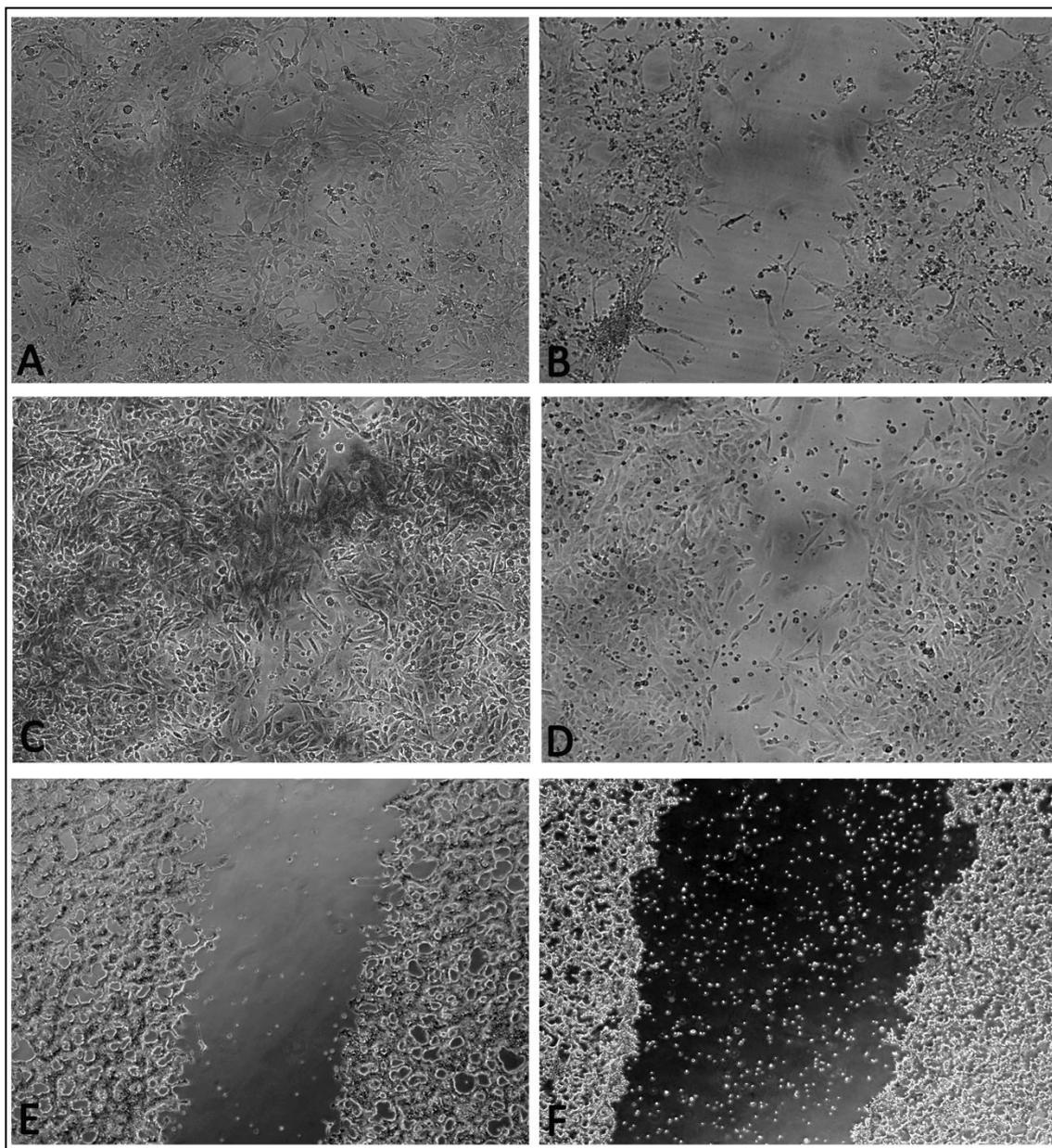


Figura 12 - Imagens obtidas a partir dos ensaios de migração realizados nas diferentes linhagens celulares com e sem o fármaco (dose IC50). Em (A) Hs578T controle após 24h de experimento, (B) Hs578T com fármaco (IC50) após 24h, (C) MDA-MB-231 controle após 24h; (D) MDA-MB-231 com fármaco (IC50) após 24h; (E) T47D controle após 72h; (F) T47D com fármaco (IC50) após 72h.

Realizamos então uma análise estatística a fim de se mensurar o percentual de migração celular destas linhagens *in vitro*, expostas ao Cediranib e avaliar se houveram diferenças significativas neste percentual entre as linhagens expostas versus as não expostas ao Cediranib.

A **Figura 13** evidencia que houve uma diminuição do percentual de migração nas linhagens celulares de carcinoma mamário, expostas ao Cediranib. A dose de IC50 aplicada em todos os subtipos foi equivalente ao IC50 de 72h, visto que o intuito do ensaio foi avaliar a capacidade de migração ao longo do tempo e, portanto, o IC50 de 24h poderia não permitir o comportamento celular ao longo do tempo, já que em 24 horas, a taxa de morte celular seria de 50% das células.

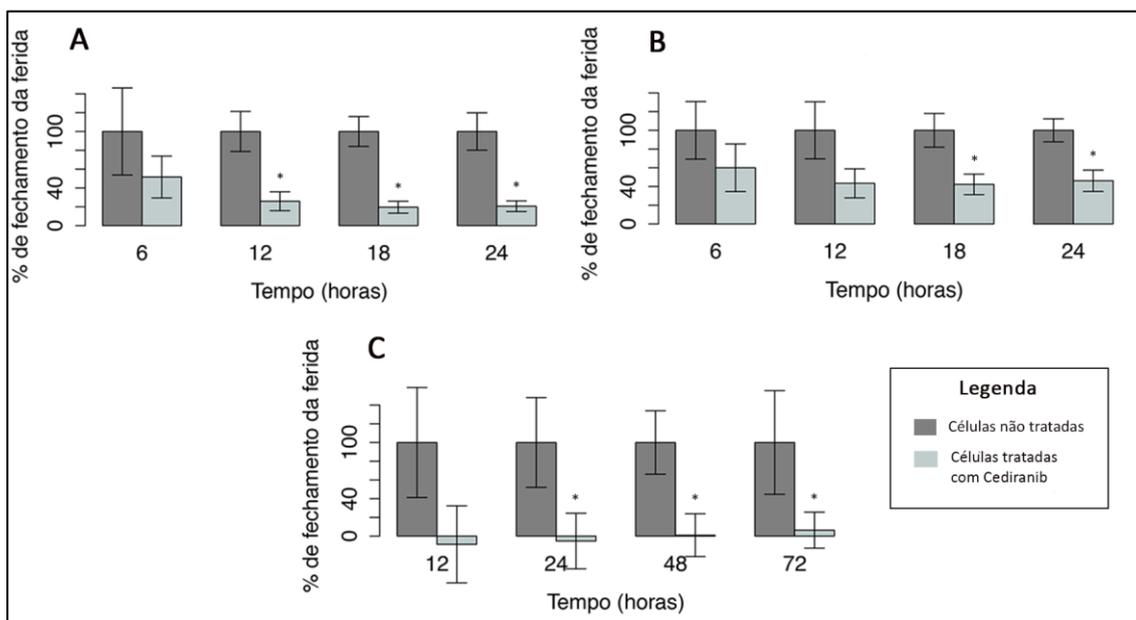


Figura 13 – Quantificação do percentual de migração celular *in vitro*. Resultados obtidos a partir dos ensaios de migração realizados nas diferentes linhagens celulares

com e sem o fármaco (dose IC50) em (A) Hs578T, (B) MDA-MB-231 e, (C) T47D. Significância estatística representada por *** indicativo de $p < 0.001$.

Nossos resultados mostraram que houve um efeito bastante significativo do Cediranib sob a capacidade de migração celular *in vitro* na linhagem Hs578T que apresentou uma diminuição significativamente estatística de 79,72% na sua migração. A linhagem MDA-MB-231 também apresentou significativa redução na capacidade de migração *in vitro* de 52,23% sob ação deste fármaco. Finalmente, em relação a linhagem T47D observamos que houve maior efeito do Cediranib na capacidade de migração celular *in vitro*, cerca de 90% do seu percentual de migração *in vitro* ($p \leq 0,001$).

6.3 Avaliação da capacidade de invasão celular *in vitro* das linhagens tumorigênicas expostas ao Cediranib

Avaliamos ainda o efeito do Cediranib sob a capacidade de invasão celular *in vitro* nestas mesmas linhagens tumorigênicas de mama (Hs578T, MDA-MB-231 e T47D) expostas ao Cediranib.

A **Figura 14** permite a visualização da capacidade de invasão *in vitro* das três linhagens celulares de carcinoma mamário, expostas ou não a ação do Cediranib.

Nossos resultados mostraram que sob ação do Cediranib as células tumorigênicas (coradas em vermelho) parecem apresentar menor capacidade de invadir o matrigel em relação às células que não foram expostas.

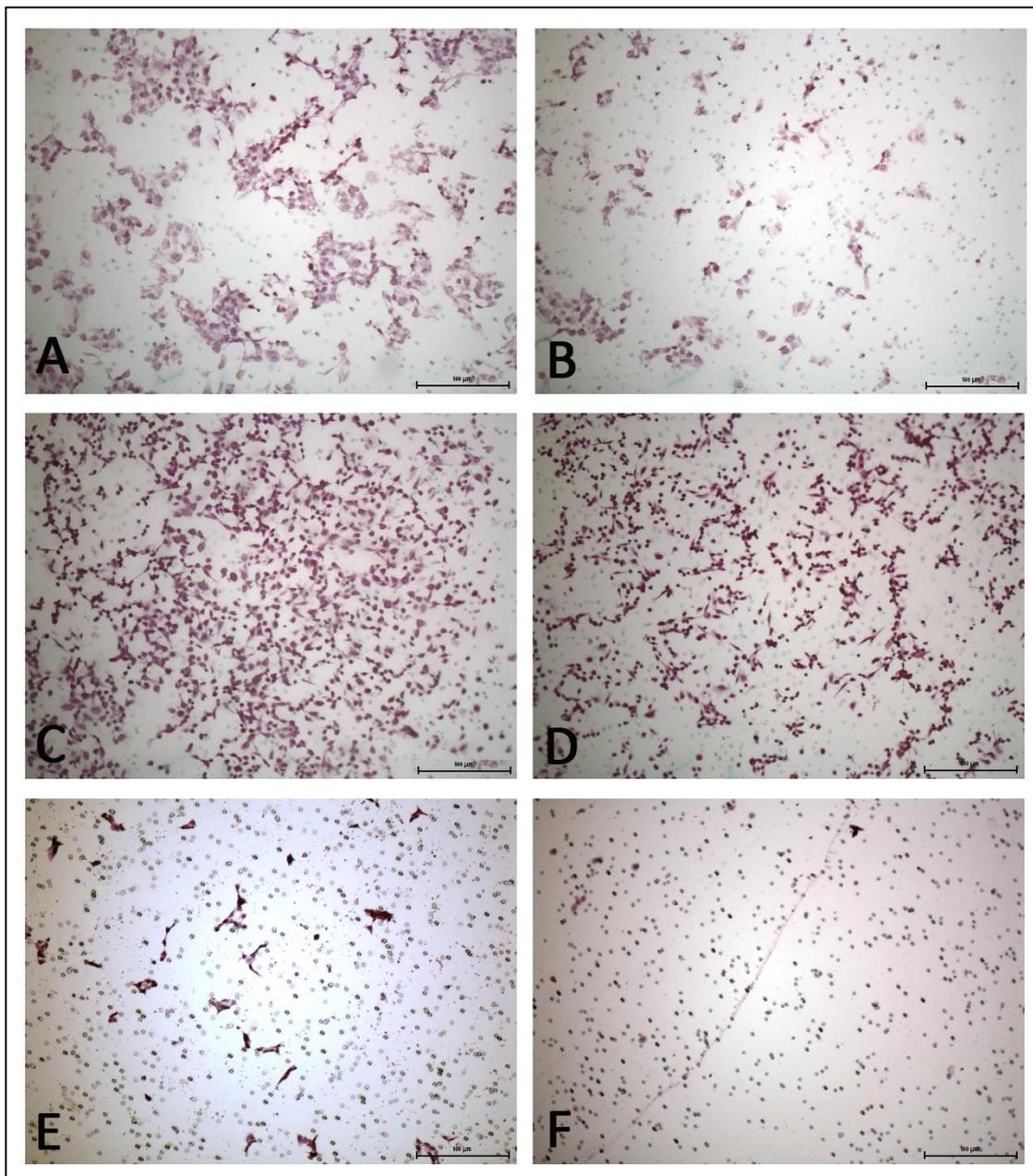


Figura 14 - Imagens obtidas a partir dos ensaios de invasão realizados nas diferentes linhagens celulares com e sem o fármaco (dose IC50). Em (A) Hs578T controle, (B) Hs578T com fármaco (IC50), (C) MDA-MB-231 controle; (D) MDA-MB-231 com fármaco (IC50); (E) T47D controle; (F) T47D com fármaco (IC50). Pontos vermelhos são células e os pontos pretos apenas os poros do matrigel.

A fim de melhor evidenciarmos o efeito do Cediranib sob a capacidade de invasão das linhagens tumorigênicas de mama, construímos gráficos comparando as linhagens expostas as não expostas ao Cediranib. A **Figura 15** mostra que houve significativa redução na capacidade de invasão celular de cerca de 50% na linhagem Hs578T exposta a ação do Cediranib na dose 1 de IC50 72h ($2\mu\text{M}$). Além disso, quando expomos esta linhagem a uma segunda dose (dose 2= $5\mu\text{M}$) observamos também um efeito ainda mais significativo no percentual de invasão *in vitro*.

Este efeito de diminuição no percentual de invasão também pode ser observada nas linhagens MDA-MB-231 e T47D expostas ao Cediranib quando comparadas com seus controles. Nestas linhagens houve uma diminuição no percentual de cerca de 30% para as linhagem MDA-MB-231 e de 70% para a linhagem T47D expostas a cerca de $2\mu\text{M}$ (dose 1) do Cediranib.

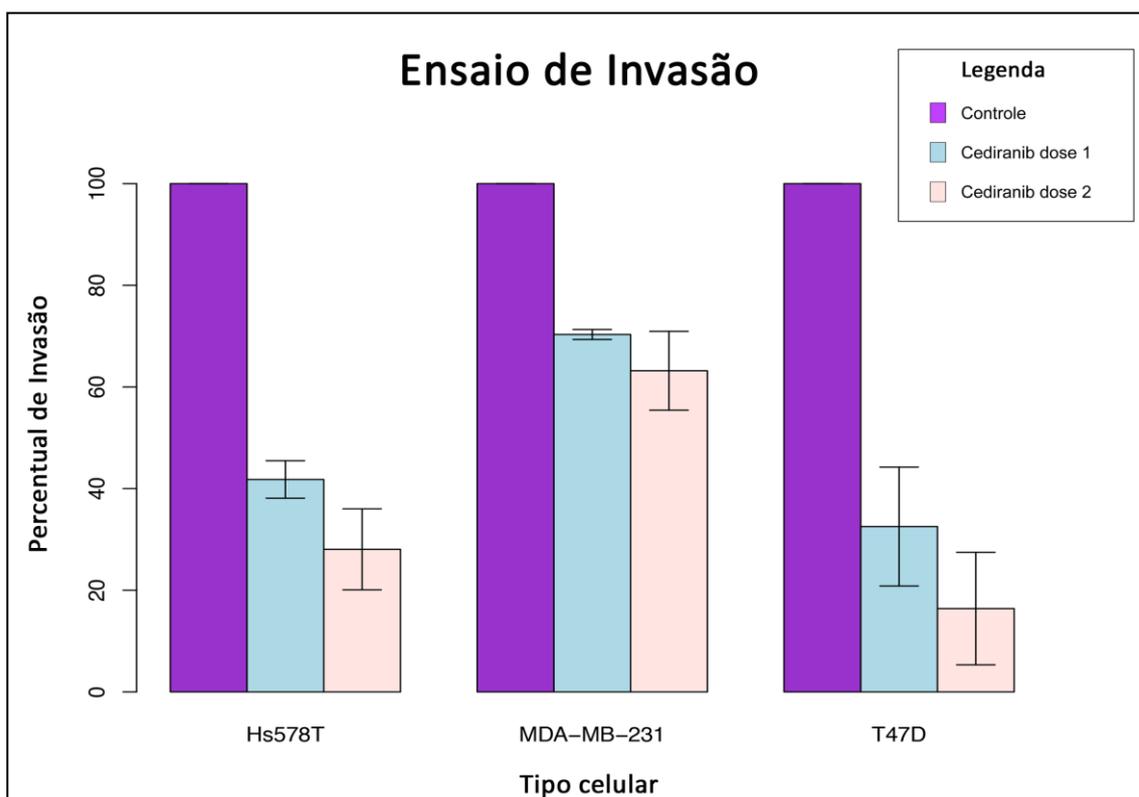


Figura 15 – Quantificação do percentual de invasão celular *in vitro*. Resultados obtidos a partir dos ensaios de invasão realizados nas diferentes linhagens celulares sem e com

o fármaco em dose 1 (IC50 em 72h) e dose 2 (média da soma dos valores de IC50-24h e IC50-72h).

6.4 Perfis de expressão diferencial de miRNAs em linhagens tumorigênicas de mama expostas ao Cediranib.

Por meio da tecnologia de microarrays, foi possível identificarmos assinaturas de expressão dos miRNAs apontados como diferencialmente expressos nas linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor expostas a ação do Cediranib.

A **figura 16** evidencia os perfis de expressão diferencial dos miRNAs, em que é possível se identificar uma nítida separação entre linhagens celulares expostas ao Cediranib em relação ao controle (não expostas), com miRNAs que se apresentaram mais ou menos expressos caracterizando as assinaturas de expressão.

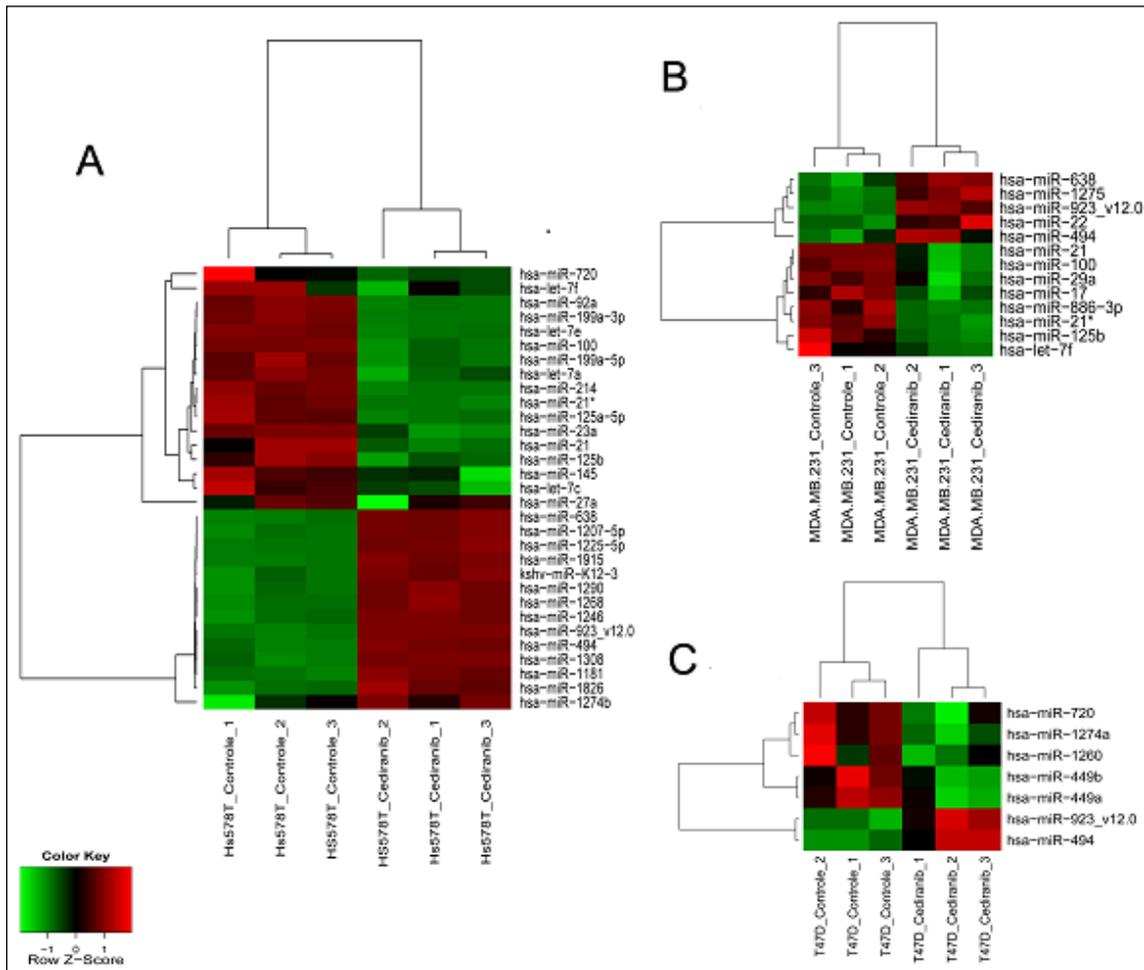


Figura 16 - Assinaturas de expressão (*heat maps*) de miRNAs apontados como diferencialmente expressos nas linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor. As linhagens Hs578T (A), MDA-MB-231 (B) e T47D (C) expostas a ação do Cediranib em relação a não exposição. Nos *Heatmaps* em questão, a cor vermelha indica hiper-expressão, a cor verde repressão, a preta não-modulação e a cinza ausência do dado.

A linhagem tumoral Hs578T (A) apresentou 31 miRNAs diferencialmente expressos, a linhagem MDA-MB-231 (B) 13 miRNAs e a linhagem T47D (C) 7 miRNAs também diferencialmente expressos com significância estatística.

A fim de identificarmos miRNAs diferencialmente expressos que são comuns à exposição ao Cediranib nas diferentes linhagens, realizamos uma análise por meio da construção de um Diagrama de Venn (**Figura 17**). Com esta análise foi possível identificar: 22 miRNAs específicos da linhagem Hs578T, 7 miRNAs comuns entre as linhagens Hs578T e MDA-MB-231, 5 miRNAs específicos da linhagem MDA-MB-231, 4 miRNAs específicos da linhagem T47D, apenas 1 miRNAs comum entre as linhagens T47D e Hs578T e finalmente 2 miRNAs que são comumente modulados (superexpressos) pela exposição ao Cediranib entre as três linhagens.

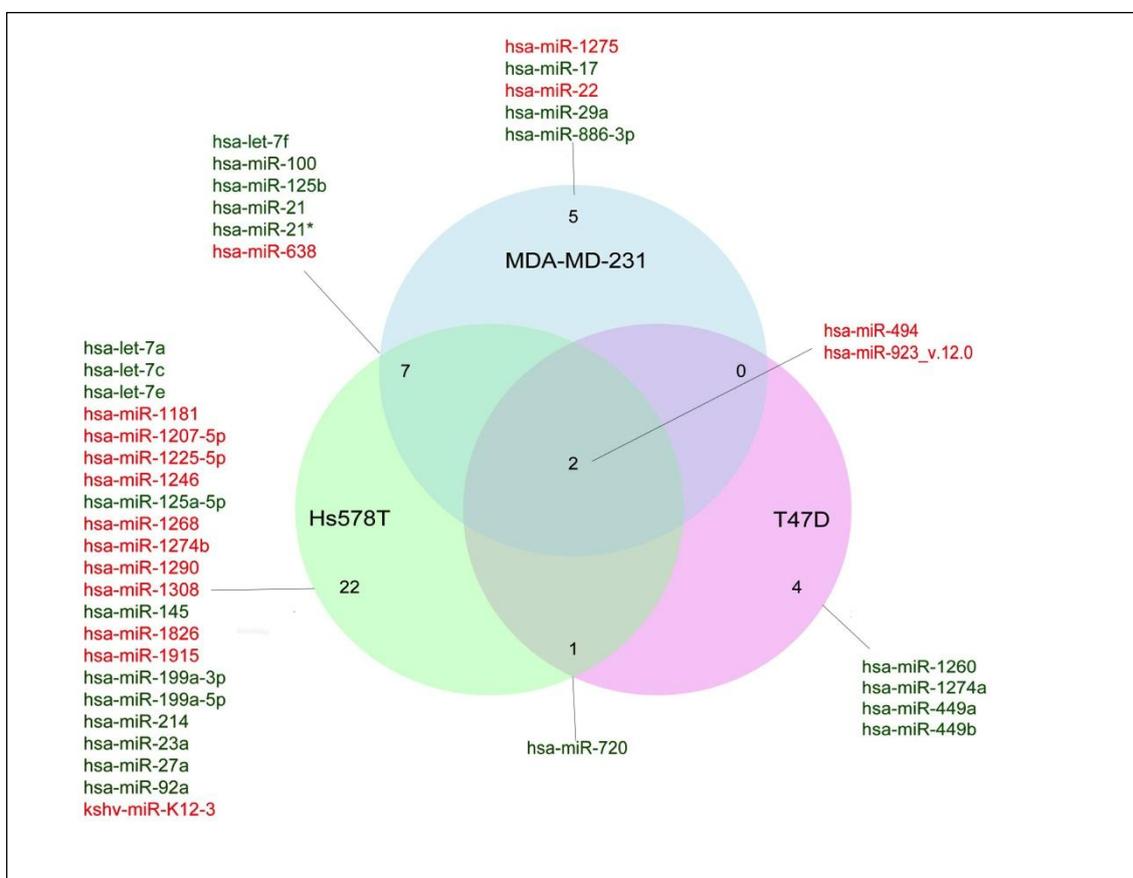


Figura 17 - Diagrama de Venn apontando os miRNAs diferencialmente expressos específicos de cada linhagem tumorigênica e comuns as três linhagens, quando expostas a ação do Cediranib. Onde hsa: Homo sapiens e kshv: Kaposi Sarcoma – associated Herpesvirus miRNA.

Na **Figura 18**, encontram-se representadas as categorias (processos biológicos, *Gene Ontology - GO*) significativas, oriundas da análise pelo banco de dados DAVID, e organizadas em grupos mais amplos. Considerando que a análise foi feita separadamente para miRNAs induzidos e reprimidos, o resultado foi separado em vermelho e verde, respectivamente. A relevância de tais categorias, isto é, o *P* value enriquecido encontra-se representado em escala de $-\log_{10}$, variando de 1.3 ($p=0.05$) a 16 ($p=1E-16$). As **Figuras 19 a 24** ilustram todas essas categorias dentro dos seus respectivos grupos.

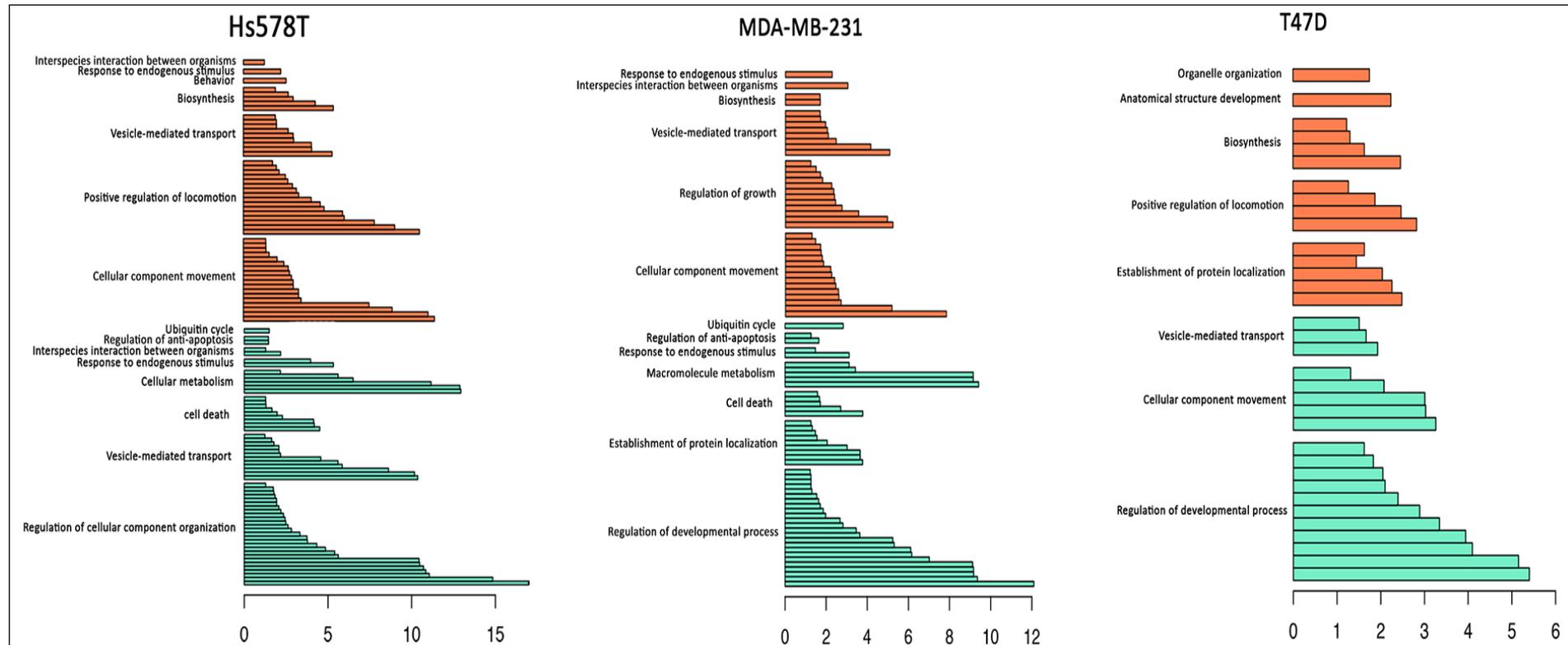


Figura 18 - Representação esquemática dos processos biológicos dos alvos dos miRNAs induzidos (vermelho) e reprimidos (verde) após exposição *in vitro* ao Cediranib nas três linhagens de estudo, Hs578T, MDA-MB-231 e T47D. Os valores encontram-se representados em escala de $-\log_{10}(P \text{ value})$.

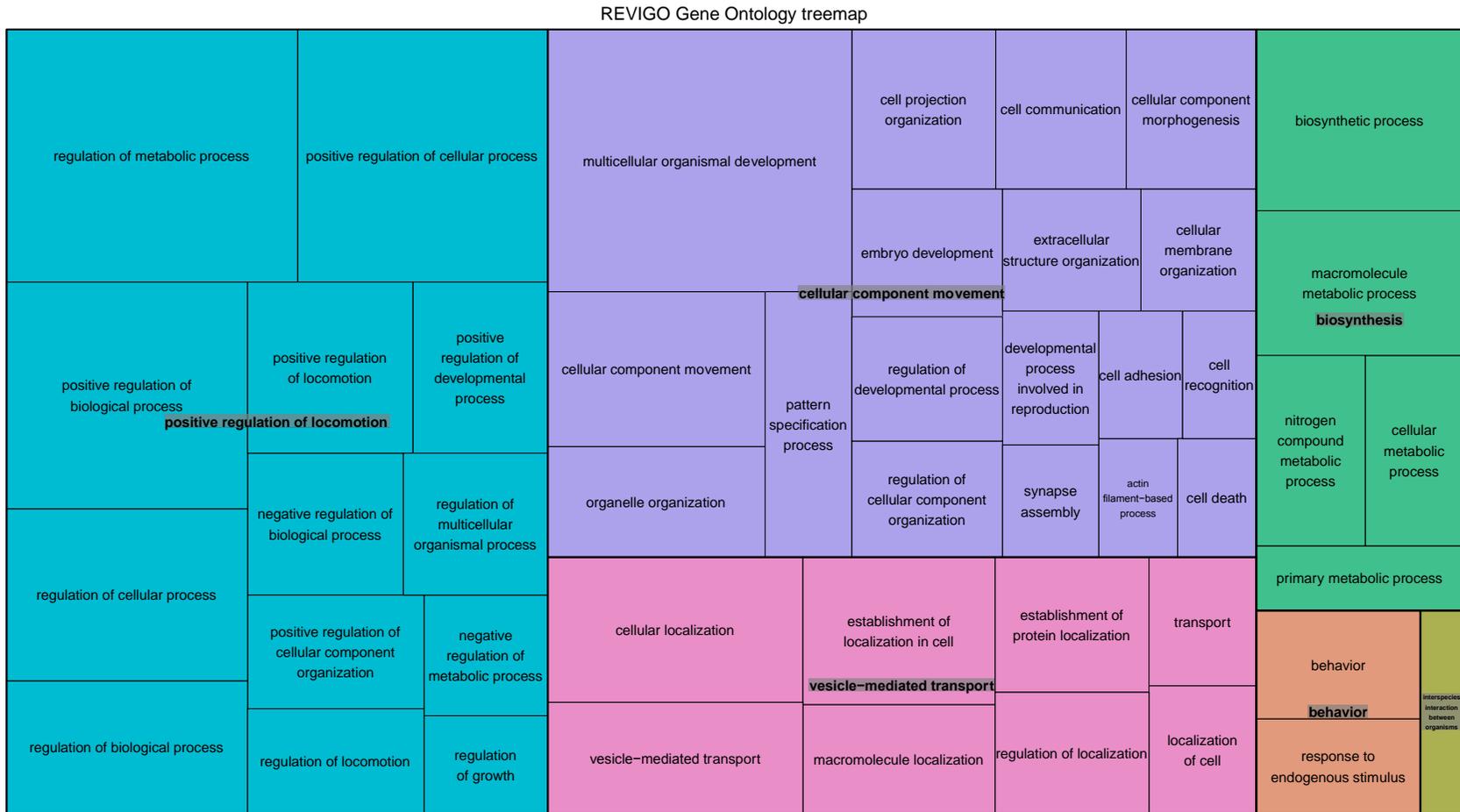


Figura 19 - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs induzidos na linhagem Hs578T após exposição *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções.

REVIGO Gene Ontology treemap

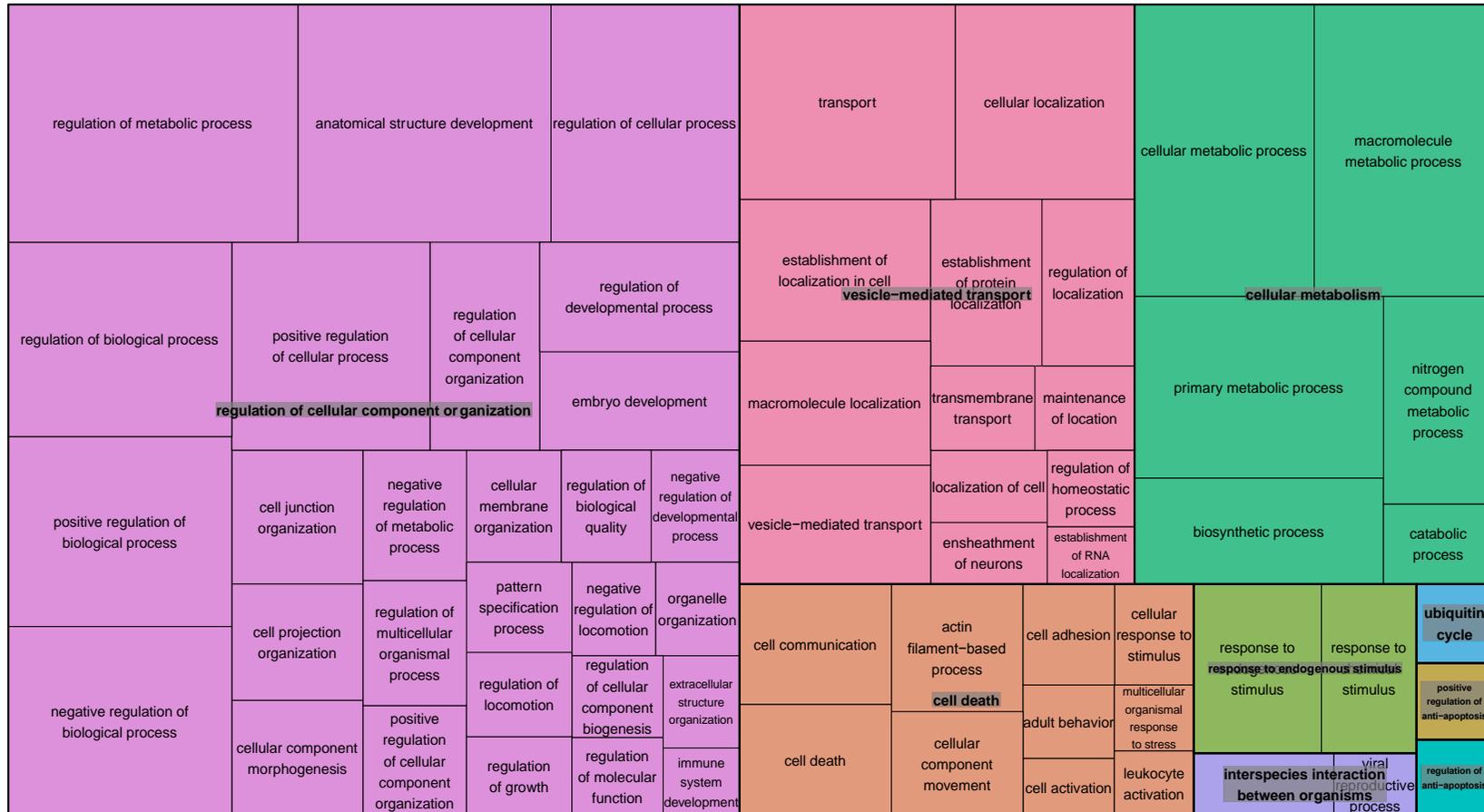


Figura 20 - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs reprimidos na linhagem Hs578T após exposição *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções.

REVIGO Gene Ontology treemap

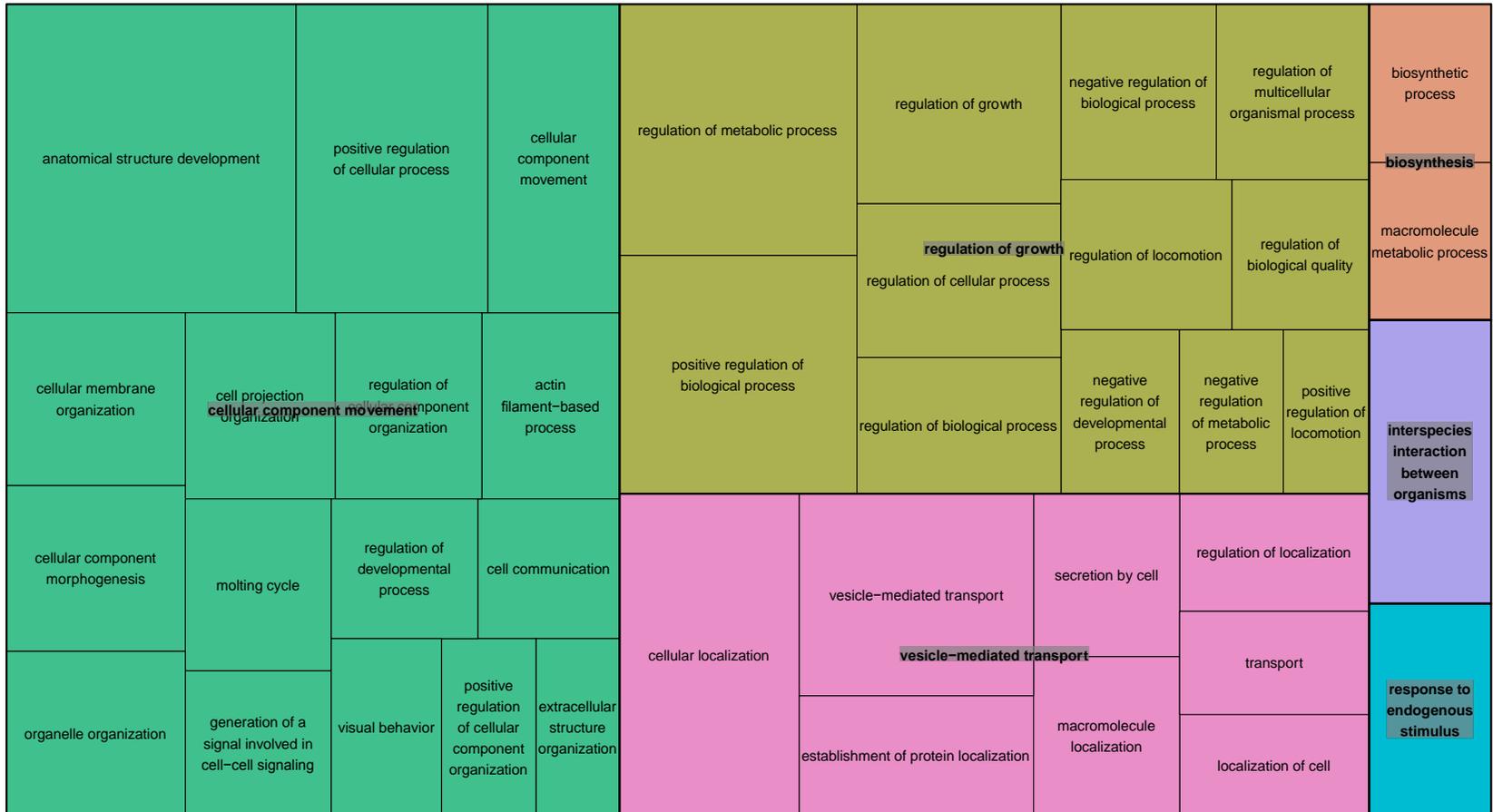


Figura 21 - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs induzidos na linhagem MDA-MB-231 expostas *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções.

REVIGO Gene Ontology treemap



Figura 22 - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs reprimidos na linhagem MDA-MB-231 exposta *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções.

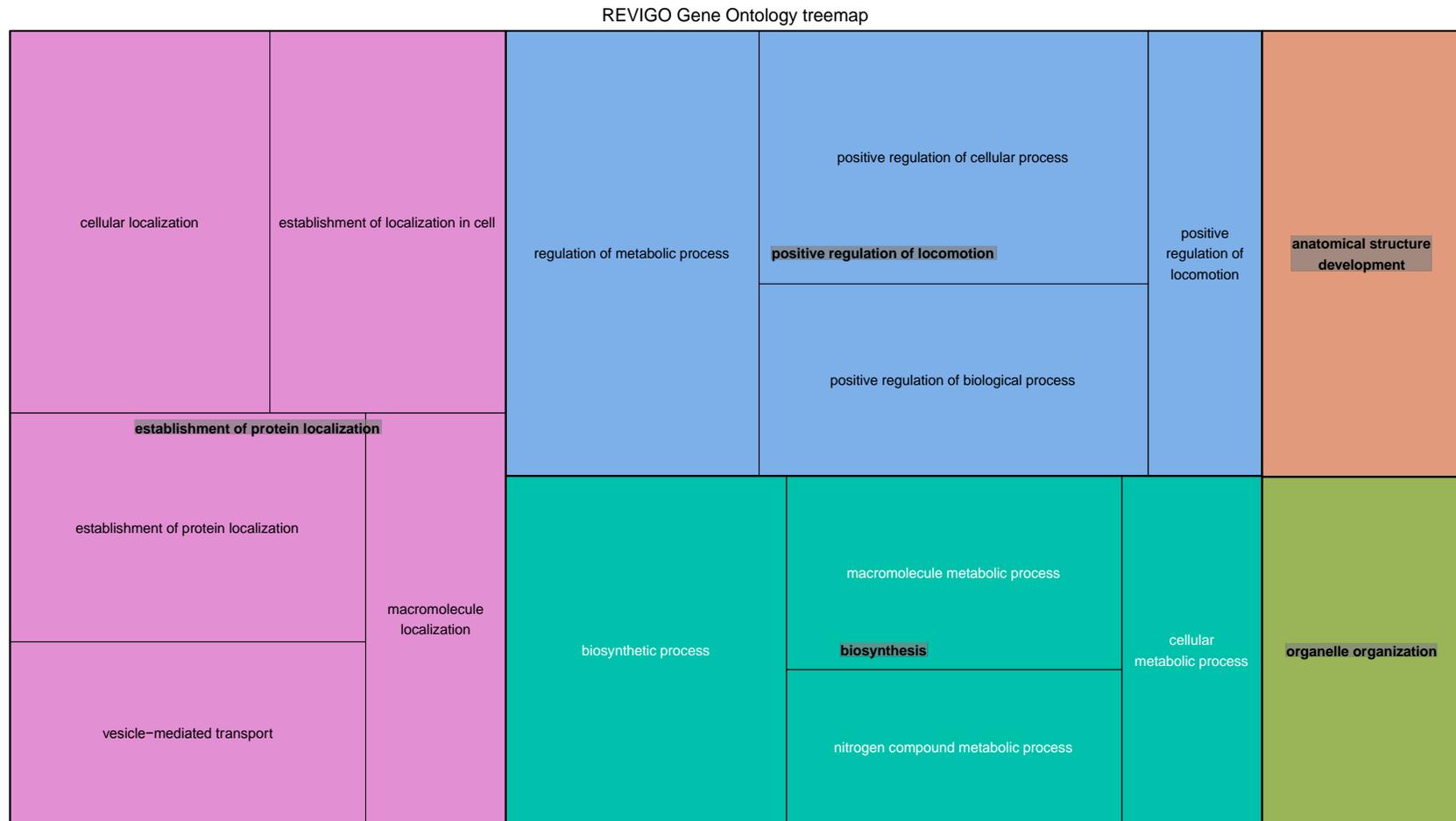


Figura 23 - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs induzidos na linhagem T47D exposta *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções.

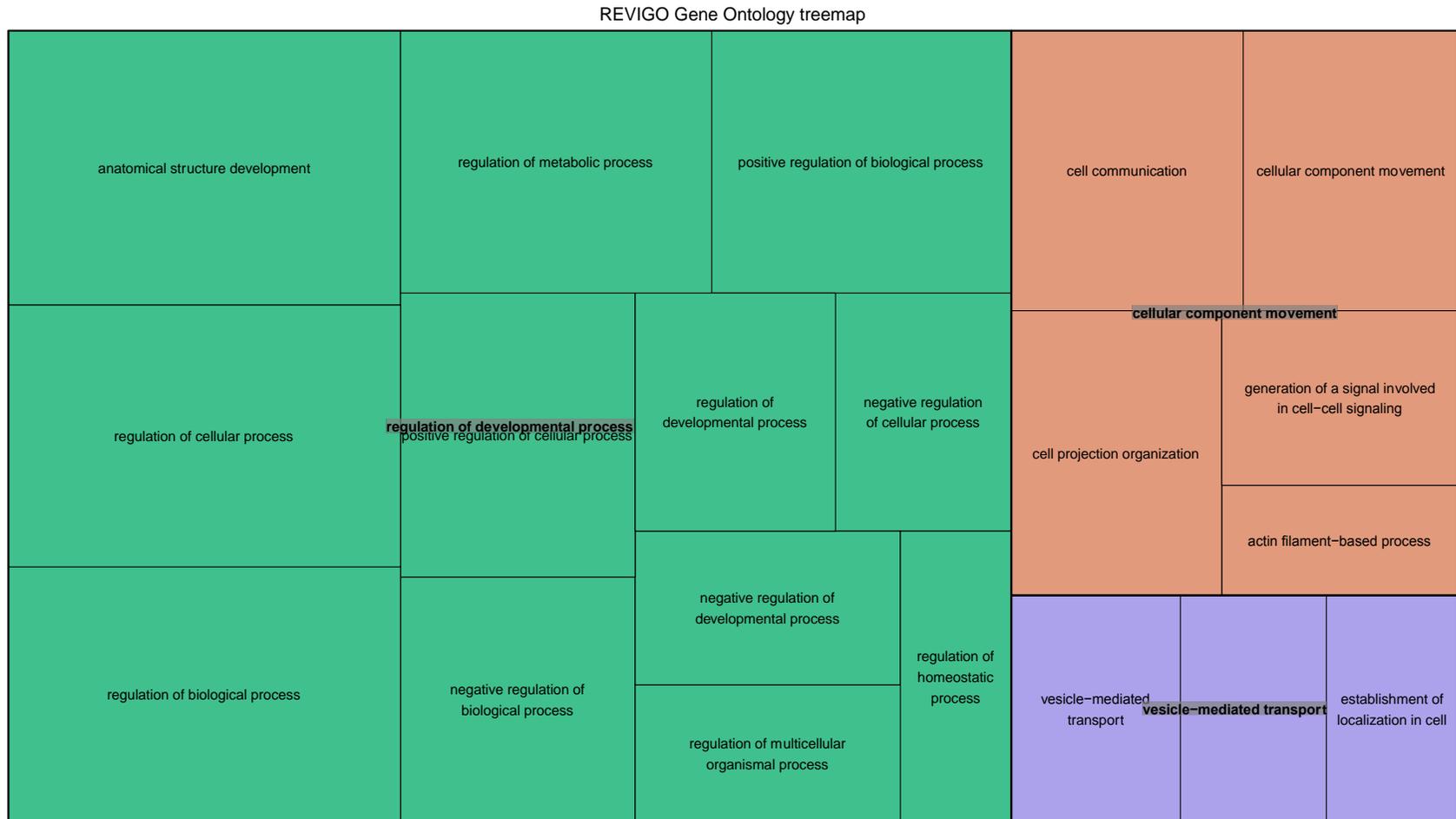


Figura 24 - Mapa dos processos biológicos significativos dos alvos dos miRNAs reprimidos na linhagem T47D exposta *in vitro* ao Cediranib, compilados de acordo com a similaridade de funções.

6.5 Confirmação dos miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens tumorigênicas de mama por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).

O método de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi utilizado para confirmar a expressão de 5 microRNAs que estavam diferencialmente expressos nas análises de *microarray* das linhagens de carcinoma mamário expostas a ação do Cediranib quando comparadas com as controles. São eles: miR-494, miR-923, miR-449a, miR-449b e miR-886-3p.

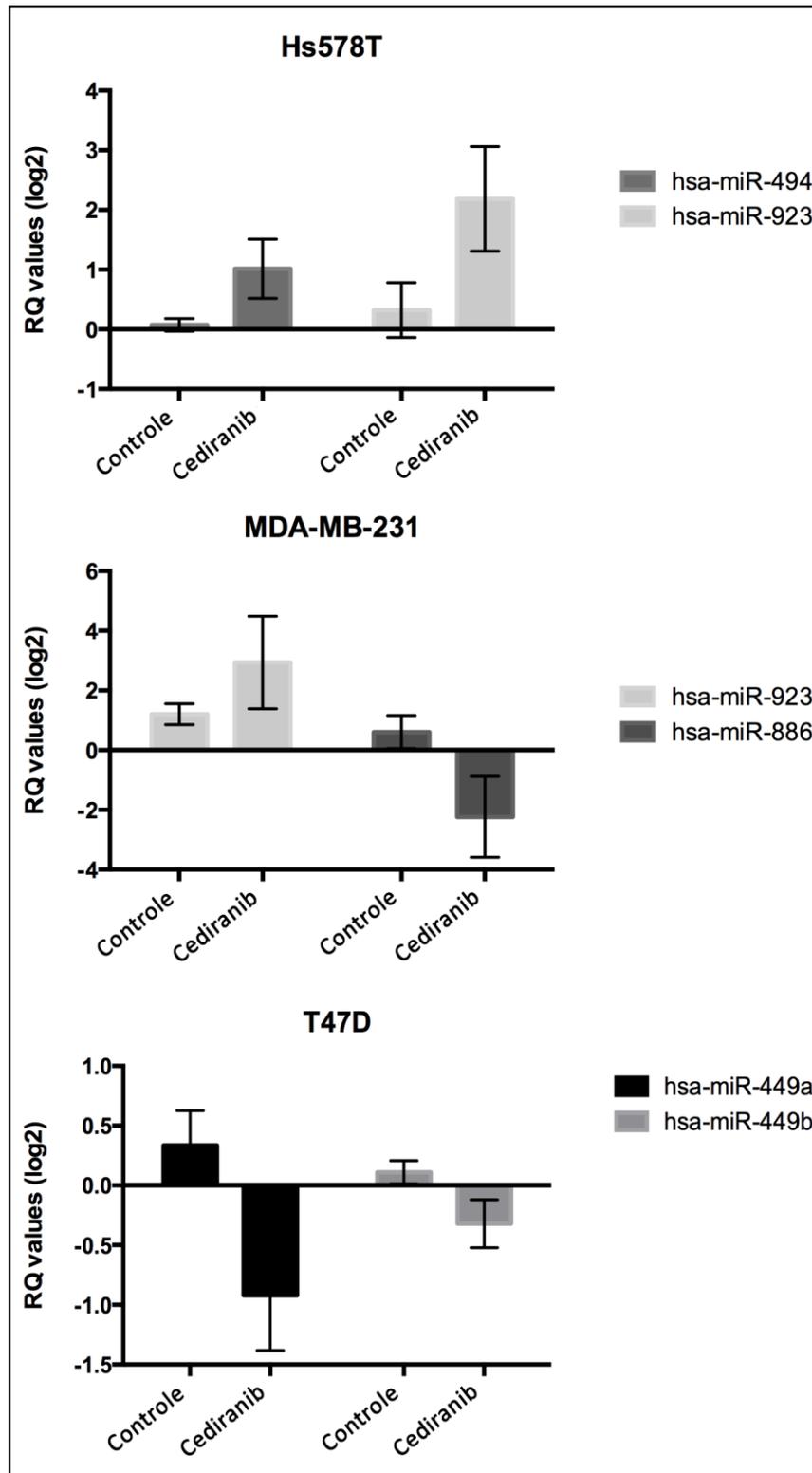


Figura 25 – Confirmação dos dados de microarrays por PCR em Tempo Real para os miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens tumorigênicas de mama expostas ao Cediranib ($p \leq 0,005$).

Nossos resultados mostraram que foi possível confirmar a superexpressão do miR-494 e miR-923 na linhagem Hs578T quando a mesma foi exposta ao Cediranib em relação a controle. Na linhagem MDA-MB-231 confirmamos a superexpressão do miR-923 e diminuição da expressão do miR-886 após exposição ao Cediranib. Finalmente confirmamos que tanto o miR-449a quanto o miR-449b estavam reprimidos na linhagem T47D após exposição ao Cediranib *in vitro*.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

No câncer de mama a quimioterapia é um tipo de tratamento clássico amplamente utilizado juntamente com terapias hormonais e alvo dirigidas. As terapias moleculares que tem como alvo receptores do tipo tirosina-quinases como o VEGFR são uma promessa para tratamento do câncer de mama, pois tem um dos objetivos inibir a progressão tumoral por abortar a formação de novos vasos sanguíneos. Isto pode acontecer por inibição da atividade tirosina-quinase do receptor VEGFR2 que exerce importante função na mediação das respostas celulares induzidas pelo fator de crescimento vascular chamado VEGF. Recentemente um novo e potente inibidor de VEGFR vem sendo apontado como importante agente anti-angiogênico no tratamento de tumores sólidos como os glioblastomas.¹¹⁴ No entanto, no contexto do câncer de mama, a eficácia do Cediranib é muito pouco explorada e os achados, por consequência, são ainda pouco conclusivos.

Sendo assim, neste estudo inicialmente avaliamos a capacidade que linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor apresentam em responder à ação do Cediranib *in vitro*. Nossos resultados mostraram que as linhagens de carcinoma mamário humano invasor Hs578T e MDA-MB-231 são responsivas à ação do Cediranib com IC50 encontrado de $2,08 \pm 0,77 \mu\text{M}$ e $2,52 \pm 0,81 \mu\text{M}$ respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Martinho et al (2013) em linhagens celulares de glioblastoma, em que a média encontrada do IC50 para o Cediranib (após 72h de exposição) foi de $1,71 \pm 0,97 \mu\text{M}$.¹¹⁴ Em gliomas o Cediranib vem apresentando resultados promissores. Em um estudo de *clinical-trial* fase II, a taxa de sobrevida livre de doença após o tratamento foi superior a 6 meses.¹¹⁵ A eficácia do Cediranib tem sido relacionada com a sua capacidade anti-angiogênica e de normalização vascular tumoral aliviando os efeitos do edema em pacientes com gliomas.^{51, 52}

Em comum, as linhagens de carcinoma mamário invasor Hs578T e MDA-MB-231 carregam a característica de serem classificadas como do subtipo molecular triplo negativo, pois não apresentam a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona

e HER2. Esta característica é por sua vez bastante interessante para este estudo, uma vez que células neoplásicas da mama com tal característica apresentam menor taxa de resposta aos diferentes tipos de tratamentos quimioterápicos e pior prognóstico na prática clínica.²⁵ Reforçando os achados da atividade anti-neoplásica do Cediranib, um recente estudo pré-clínico desenvolvido com ratos xenotransplantados com a linhagem de câncer de mama, MX-1, demonstrou resultados citotóxicos do Cediranib em combinação com docetaxel.⁶¹ Vale ressaltar, que MX-1 também apresenta receptores hormonais negativos¹¹⁶, ou seja, com características celulares do subtipo molecular triplo negativo.

Em relação à linhagem celular de carcinoma mamário humano invasor T47D também avaliada neste nosso trabalho, encontramos resultados bastante diferente, pois estas células parecem ser menos sensíveis a ação do Cediranib, apresentando um IC50 de $18,85 \pm 3,21 \mu\text{M}$.

Por meio de ensaios celulares *in vitro* em que avaliamos a influência do Cediranib no percentual de migração e invasão celular, nossos resultados mostraram que todas as linhagens de carcinoma mamário invasor apresentaram redução significativa no percentual de migração quando expostas ao Cediranib.

Curiosamente, a linhagem T47D apresentou um menor percentual de migração *in vitro* quando comparada com as outras linhagens, esse achado é consistente com o estudo realizado por Van Horssen & Hollestelle que demonstrou a baixa capacidade de migração da linhagem T47D quando nenhum elemento de crescimento ou revestimento foi adicionado. Ainda de acordo com esse estudo, o fenótipo de baixa capacidade de migração foi associado com a característica do *status wild type* de E-caderina encontrado nessa linhagem, que difere da linhagem MDA-MB-231, cuja E-caderina está metilada, conferindo um fenótipo mais invasivo.¹¹⁹ Condizentemente com esse argumento, um estudo anterior realizado por Pierceall et al (1995) já haviam relatado que a linhagem Hs578T não possui expressão detectável de E-caderina.¹¹⁸ Vale ressaltar ainda, que a perda funcional das proteínas de adesão E-caderina, é considerada o evento mais importante relacionado com transição epitelio-

mesênquima, uma vez que permite motilidade as células tumorais previamente estacionárias.¹¹⁹

Observamos ainda neste estudo que 2 μ M do (IC50 72hs ou dose 1) Cediranib foi capaz de inibir o percentual de invasão celular em 50% na linhagem Hs578T quando comparada com o controle. Além disso, quando adicionamos uma quantidade maior cerca de 5 μ M, este percentual de invasão diminui ainda mais (cerca de 70%) mostrando que o Cediranib parece exercer um efeito na célula do tipo dose-dependente, o que condiz com a literatura. De maneira semelhante, a linhagem MDA-MB-231 também mostrou uma diminuição no percentual de invasão, no entanto, isso ocorreu de maneira mais discreta, com uma diminuição no percentual de invasão celular de cerca de 30% quando as células são expostas ao Cediranib. Este fato é bastante curioso, pois mostra características intrínsecas desta linhagem que, apesar de ser molecularmente classificada em tripo negativa, como a Hs578T, o Cediranib parece ter um efeito menos significativo nesta linhagem.

A linhagem T47-D foi surpreendentemente a linhagem que mais teve alteração no seu percentual de invasão celular *in vitro*, pois a exposição ao Cediranib foi capaz de reduzir em 70% seu potencial quando comparada com o controle. De maneira semelhante à linhagem Hs578T este comportamento parece ser também do tipo dose dependente em que doses maiores do Cediranib parecem diminuir ainda mais o percentual de invasão *in vitro* deste tipo celular.

Considerando o exposto, nossos achados revelam que, no contexto do câncer de mama, os testes *in vitro* com Cediranib demonstraram resultados promissores, por aparentemente exercer um novo papel como agente anti-neoplásico que poderia influenciar no processo de migração e invasão celular.

Recentemente os miRNAs, têm sido envolvidos como importantes reguladores de processos biológicos importantes para iniciação, progressão e metástase do câncer assim como tem se sugerido sua aplicação como nova ferramenta para detecção e terapia de vários tipos de tumores incluindo o câncer de mama.¹²⁰

Sabidamente, os perfis de expressão de miRNAs em tumores humanos permitem descobertas sobre caminhos que levam a tumorigênese, isto porque os tumores apresentam assinaturas específicas de miRNAs que nos permitem melhor entender os mecanismos moleculares que regem este processo e, conseqüentemente, conduzem a informações sobre o prognóstico dos pacientes.¹²¹

Neste estudo utilizamos linhagens celulares de carcinoma mamário humano invasor expostas a ação do Cediranib um potente agente inibidor de receptores do tipo tirosina quinases como VEGFR e que apresenta resultados promissores como potente agente anti-angiogênico em alguns tumores sólidos. Nossos resultados mostraram que foi possível determinar assinaturas de expressão de miRNAs, específicas das linhagens expostas a ação do Cediranib quando comparadas às linhagens controles.

As análises dos dados de microarrays permitiu uma nítida separação entre as linhagens de carcinoma mamário invasor expostas a ação do Cediranib frente as linhagens controles. Foi possível identificar: 32 miRNAs diferencialmente expressos na linhagem Hs578T (12 induzidos e 20 reprimidos), 14 miRNAs diferencialmente expressos na linhagem MDA-MB-231 (5 induzidos e 9 reprimidos) além de 7 miRNAs diferencialmente expressos na linhagem T47D (2 induzidos e 5 reprimidos). Observamos por meio da construção de um diagrama de Venn que os miRNAs miR-494 e miR-923 se apresentaram superexpressos em todas as linhagens tumorigênicas expostas à ação do Cediranib. Existem poucos estudos associando a indução da expressão destes miRNAs com o câncer de mama. Um estudo recente mostrou que a super-expressão do miR-494, *in vitro*, foi associada a produção de citocinas, como TGF- β pelas células tumorais de mama e que este aumento na expressão de miR-494 é um evento importante para promover a expansão de células tumorais podendo ser um importante alvo para terapias.¹²²

A análise do diagrama de Venn também mostrou que as linhagens Hs578T e MDA-MB-231 apresentaram uma diminuição da expressão do miR-125b quando expostas ao Cediranib. Este é um resultado bastante interessante considerando que o aumento da expressão deste miRNA em células de câncer de mama está associado a

indução da transição epitélio- mesênquima.¹²³ Portanto, ao que parece, o Cediranib pode levar a modulação de determinados miRNAs desempenhando talvez um importante efeito anti-neoplásico em linhagens tumorais de mama.

A fim de melhor compreendermos o envolvimento dos miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens tumorigênicas de mama após exposição ao Cediranib, realizamos uma análise *in silico* utilizando o banco de dados DAVID. Nossos resultados mostraram várias categorias significativas que são equivalentes aos principais processos biológicos nos quais participam genes que são regulados pelos miRNAs apontados como induzidos ou reprimidos.

A análise de enriquecimento de vias por categorias mostrou que os miRNAs induzidos na linhagem Hs578T, após exposição ao Cediranib, estão em sua grande maioria relacionados a biossíntese de macromoléculas, transporte celular mediado por vesículas, regulação da motilidade celular (que inclui o crescimento celular) e resposta a estímulos endógenos.

Por outro lado, os miRNAs reprimidos na linhagem Hs578T, sob a ação do Cediranib, regulam genes importantes associados principalmente aos processos de organização celular, morte, transporte mediado por vesículas, e metabolismo celular. Estes achados são bastante originais e interessantes, pois nos ajudam a melhor entender a significativa diminuição no percentual de migração celular desta linhagem (cerca de 70%) quando exposta ao Cediranib. Certamente, estudos funcionais *in vitro* se fazem necessários para melhor entender o real papel dos miRNAs nestes processos celulares.

De maneira semelhante, a análise *in silico* nos permitiu observar que os miRNAs induzidos na linhagem MDA-MB-231 também estão diretamente relacionados à regulação de genes importantes envolvidos nos mesmos processos biológicos identificados na linhagem anterior. Além disso, a análise *in silico* também apontou que os miRNAs induzidos na linhagem MDA-MB-231 exposta ao Cediranib, tiveram ainda significativa participação na regulação de genes envolvidos com a regulação do crescimento celular. De fato, quando observamos a capacidade de migração celular

destas duas linhagens expostas ao Cediranib, é possível notar significativa diminuição no percentual migração celular *in vitro* destas linhagens, que foi de cerca de 80% para Hs578T e 52% para MDA-MB-231.

Em relação à linhagem T47D, observamos que a grande maioria dos miRNAs induzidos estão associados à regulação da expressão de genes envolvidos principalmente na biossíntese de proteínas, organização celular e regulação positiva do movimento celular. Este fato é bastante interessante uma vez que apesar do percentual de migração celular desta linhagem ter sido relativamente menor quando exposta ao Cediranib (cerca de 22%), por outro lado, foi a linhagem que apresentou maior redução no percentual de invasão celular *in vitro* (cerca de 70%). Quanto aos miRNAs reprimidos na linhagem T47D, foi possível observar que apresentam envolvimento na regulação de genes importantes em três principais processos biológicos: transporte mediado por vesícula, movimentação de componentes celulares (incluindo comunicação e organização celular) e regulação negativa da proliferação celular.

Considerando o potencial destes miRNAs apontados como diferencialmente expressos conseguimos ainda confirmar a superexpressão do miR-494 e mir-923 por PCR em Tempo Real, na linhagem Hs578T exposta ao Cediranib. Na linhagem MDA-MB-231 confirmamos que o miR-923 estava induzido e o miR-886 estava reprimido após a exposição ao Cediranib. E, finalmente, na linhagem T47D confirmamos a repressão do miR-449a e mir-449b após a exposição ao Cediranib.

Conforme já salientado, o miR-494 tem a sua função ainda pouco explorada no carcinoma de mama, no entanto, num estudo realizado por Liu et al (2012) o miR494 foi encontrado por regular células supressoras mielóides-derivadas que apresentam capacidade de suprimir a resposta imunológica anti-tumoral, portanto, a sua expressão demonstrou ter um papel na indução da invasão, angiogênese e metástase.¹²² De acordo com os autores, o miR-494 regula negativamente o supressor tumoral PTEN e consequentemente aumenta a atividade de AKT alterando o sinal intrínseco de sobrevivência e apoptose, além de induzir a expressão de matriz de

metaloproteinases (MMP). Contradizendo esse achado, um estudo realizado por Kim et al (2011) com células de tumor gastro-intestinal estromal (GIST), encontrou que a superexpressão de miR-494 culminou com a diminuição da proliferação celular, além de reduzir a expressão de KIT, evidenciando seu papel como um supressor tumoral no câncer gástrico ¹²⁴. Corroborando com estes achados, um estudo realizado com células de carcinoma de cabeça e pescoço, mostrou pela tecnologia de microarrays a diminuição da expressão do miR-494, nas células tumorais quando comparado ao tecido normal. Embora esses resultados não tenham sido confirmados por PCR em tempo real, há mais uma evidência do papel supressor tumoral desse microRNA. ¹²⁵

Além disso, a região gênica Dlk1-DIO3, onde o miR-494 está localizado, é descrita por abrigar miRNAs supressores tumorais, cuja função estaria associada a inibição da transição epitelial-mesenquimal, considerada, um passo fundamental para inibir a metástase e proliferação de células tumorais. ¹²⁶ Portanto, verificamos que a escassez de informações sobre o papel de miR-494 associada aos dados contraditórios sobre sua função, torna este achado mais interessante e ressalta a pertinência de mais estudos para ampliar nossa compreensão.

Ainda na linhagem Hs578T e também na linhagem MDA-MB-231 foi possível confirmar a superexpressão do miR-923 nas células tratadas com o Cediranib em relação ao controle. Estudos na literatura a respeito deste miRNA no câncer de mama são escassos. Há um estudo realizado com linhagens celulares de carcinoma mamário MDA-MB-435 sensíveis e resistentes ao taxol que encontrou a superexpressão deste microRNA nas linhagens resistentes. ¹²⁷

Nossos resultados demonstram também a confirmação da redução da expressão de miR886-3p na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com Cediranib. Embora os alvos de miR886-3p permaneçam desconhecidos em câncer de mama, um estudo recente mostrou que a regulação negativa de miR-886-3p nas amostras de tecido parafinado de pacientes com tumor de pequenas células de pulmão relacionou-se com a menor sobrevida desses pacientes, sugerindo um papel potencialmente supressor desse miRNA. Adicionalmente, esse estudo ainda sugere que a superexpressão deste

miRNA em cultura de células regula pós- transcricionalmente genes alvo, como: PLK1 e TGF- β 1.¹²⁸ Em concordância com este achado, um estudo prévio já havia sugerido um possível papel supressor tumoral de miR886-3p em linhas celulares de câncer de tireóide, uma vez que houve validação *in vitro* da inibição desse microRNA em células tumorais em relação as células normais da tireóide.¹²⁹ O estudo relacionou ainda, que o miR-886-3p atua na proliferação celular e migração, regulando genes envolvidos na replicação DNA. Curiosamente, de acordo com Jeon SH et al (2012), o pré-miR-886 (*no coding* RNA-886) demonstra uma função paradoxal na carcinogênese que pode levar a apoptose ou proliferação celular, dependendo da etapa da carcinogênese e mecanismos de escape imunológicos.¹³⁰ Portanto, considerando a escassez de estudos com miR-886-3p, nossos achados demonstram a necessidade de elucidar o papel específico desse miRNA.

A linhagem T47D teve a confirmação da redução da expressão de miR-449a e miR-449b por qRT-PCR após a exposição ao Cediranib. De acordo com Yang et al (2009)¹³¹(Yang, Feng et al. 2009)¹³¹, E2F1 foi encontrado como alvo de miR-449a e miR-449b, que por sua vez seria regulador do ciclo celular por atuar em ciclinas (CDK6 e CDC25A) que regulam diretamente a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Esses achados demonstram um aparente papel de miR-449a e miR-449b como supressores tumorais, visto a sua capacidade de promover a parada do ciclo celular e consequente inibição da proliferação.¹³¹ A regulação negativa desses microRNAs após a exposição ao fármaco, torna esse achado muito interessante, uma vez que esta linhagem apresentou-se mais resistente ao fármaco e esse mecanismo de escape pode justificar nosso achado.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- Nossos resultados mostraram uma diminuição na capacidade de migração das linhagens celulares quando exposta ao Cediranib, essa redução foi de 79,72% na Hs578T, 52,23% na linhagem MDA-MB-231 e 22,55% na linhagem T47D.
- Foi possível verificar que a exposição ao Cediranib diminuiu significativamente o percentual de invasão das linhagens tumorigênicas de mama: Hs578T, MDA-MB-231 e T47D.
- Conseguimos obter assinaturas de expressão diferencial das linhagens Hs578T, MDA-MB-231 e T47D expostas à ação do Cediranib *in vitro*, por meio da tecnologia de microarrays.
- Foi possível identificar miRNAs comumente induzidos *in vitro* nas linhagens celulares de carcinoma mamário invasor expostas ao Cediranib, por meio da construção de um diagrama de Venn.
- A análise funcional *in silico*, utilizando o banco de dados DAVID, revelou que os miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens tumorigênicas expostas ao Cediranib regulam a expressão de genes envolvidos em vários processos biológicos como: resposta a estímulos endógenos, morte celular, metabolismo celular, crescimento e comunicação celular.
- Foi possível confirmar a superexpressão do miR-494 na linhagem Hs578T e a superexpressão do miR-923 tanto na linhagem Hs578T como na linhagem MDA-MB-231. Além disso, houve a diminuição da expressão do miR886-3p na linhagem MDA-MB-231, bem como a redução da expressão do miR-449a e miR-449b na linhagem T47D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. *Estimativa 2012 Incidência de Câncer no Brasil - Instituto Nacional do Câncer (INCA)*. [Internet] Rio de Janeiro 2012; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>.
2. Redig AJ, McAllister SS. *Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis*. **J Intern Med**. 2013;274(2):113-26.
3. Duarte M, Longatto FA, Schmitt CF. *Angiogenesis, haemostasis and cancer: new paradigms and old concerns*. **J Bras Patol Med Lab**. 2007;43(6):441-9.
4. Rykala J, Przybylowska K, Majsterek I, Pasz-Walczak G, Sygut A, Dziki A, et al. *Angiogenesis Markers Quantification in Breast Cancer and Their Correlation with Clinicopathological Prognostic Variables*. **Pathology oncology research : POR**. 2011.
5. Zetter BR. *Angiogenesis and tumor metastasis*. **Annual review of medicine**. 1998;49:407-24.
6. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. *Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis*. **Breast cancer research : BCR**. 2000;2(4):252-7.
7. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. *Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response*. **Nature reviews Cancer**. 2008;8(6):425-37.
8. Kimbro KS, Simons JW. *Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer*. **Endocr Relat Cancer**. 2006;13(3):739-49.
9. Yamazaki Y, Morita T. *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. **Molecular diversity**. 2006;10(4):515-27.
10. Timoshenko AV, Rastogi S, Lala PK. *Migration-promoting role of VEGF-C and VEGF-C binding receptors in human breast cancer cells*. **British journal of cancer**. 2007;97(8):1090-8.
11. Denduluri N, Tan AR, Walshe J, Berman A, Yang SX, Chow CK, et al. *A pilot study to evaluate the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AZD2171 and chemotherapy in locally advanced and inflammatory breast cancer*. **Clin Breast Cancer**. 2005;6(5):460-3.
12. Lu H, Shu XO, Cui Y, Kataoka N, Wen W, Cai Q, et al. *Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival*. **Cancer Res**. 2005;65(12):5015-9.
13. Viacava P, Naccarato AG, Bocci G, Fanelli G, Aretini P, Lonobile A, et al. *Angiogenesis and VEGF expression in pre-invasive lesions of the human breast*. **The Journal of pathology**. 2004;204(2):140-6.

14. Bando H, Brokelmann M, Toi M, Alitalo K, Sleeman JP, Sipos B, et al. *Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues.* **International journal of cancer Journal international du cancer.** 2004;111(2):184-91.
15. Donnem T, Al-Shibli K, Andersen S, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM. *Combination of low vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)/VEGF receptor 2 expression and high lymphocyte infiltration is a strong and independent favorable prognostic factor in patients with nonsmall cell lung cancer.* **Cancer.** 2010;116(18):4318-25.
16. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmen C, et al. *Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia.* **Blood.** 2005;105(12):4642-8.
17. Gouw AS, Zeng W, Buiskool M, Platteel I, van den Heuvel MC, Poppema S, et al. *Molecular characterization of the vascular features of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma: a role for angiopoietin-1.* **Hepatology.** 2010;52(2):540-9.
18. Eckhardt BL, Francis PA, Parker BS, Anderson RL. *Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer.* **Nat Rev Drug Discov.** 2012;11(6):479-97.
19. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.* **Cancer Biol Ther.** 2010;10(10):955-60.
20. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.* **J Clin Oncol.** 2010;28(10):1684-91.
21. Weigel MT, Dowsett M. *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction.* **Endocr Relat Cancer.** 2010;17(4):R245-62.
22. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. *Combinatorial biomarker expression in breast cancer.* **Breast Cancer Res Treat.** 2010;120(2):293-308.
23. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. *Predictive markers in breast cancer--the present.* **Histopathology.** 2008;52(1):82-90.
24. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists.* **Mod Pathol.** 2011;24(2):157-67.
25. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. *The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.* **Clin Cancer Res.** 2007;13(8):2329-34.
26. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98(19):10869-74.

27. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003;100(14):8418-23.
28. Liang YJ, Wang QY, Zhou CX, Yin QQ, He M, Yu XT, et al. *MiR-124 targets Slug to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer*. **Carcinogenesis**. 2012;34(3):713-22.
29. Munagala R, Aqil F, Gupta RC. *Promising molecular targeted therapies in breast cancer*. **Indian journal of pharmacology**. 2011;43(3):236-45.
30. Crown J, Kennedy MJ, Tresca P, Marty M, Espie M, Burris HA, et al. *Optimally tolerated dose of lapatinib in combination with docetaxel plus trastuzumab in first-line treatment of HER2-positive metastatic breast cancer*. **Ann Oncol**. 2013;24(8):2005-11.
31. Cortes J, Baselga J, Im YH, Im SA, Pivot X, Ross G, et al. *Health-related quality-of-life assessment in CLEOPATRA, a phase III study combining pertuzumab with trastuzumab and docetaxel in metastatic breast cancer*. **Ann Oncol**. 2013.
32. Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, et al. *Randomized Phase II Study of the Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. **J Clin Oncol**. 2013;31(20):2586-92.
33. Block M, Grundker C, Fister S, Kubin J, Wilkens L, Mueller MD, et al. *Inhibition of the AKT/mTOR and erbB pathways by gefitinib, perifosine and analogs of gonadotropin-releasing hormone I and II to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells*. **Int J Oncol**. 2012;41(5):1845-54.
34. LoRusso PM. *Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment*. **Oncology**. 2013;84(1):43-56.
35. Borders EB, Bivona C, Medina PJ. *Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents*. **Am J Health Syst Pharm**. 2010;67(24):2095-106.
36. Dedes KJ, Wilkerson PM, Wetterskog D, Weigelt B, Ashworth A, Reis-Filho JS. *Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations*. **Cell Cycle**. 2011;10(8):1192-9.
37. Pierce A, McGowan PM, Cotter M, Mullooly M, O'Donovan N, Rani S, et al. *Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines*. **Cancer Biol Ther**. 2013;14(6):537-45.

38. Chuang HC, Kapuriya N, Kulp SK, Chen CS, Shapiro CL. *Differential anti-proliferative activities of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in triple-negative breast cancer cells.* **Breast Cancer Res Treat.** 2012;134(2):649-59.
39. Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL. *Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer.* **J Clin Oncol.** 2009;27(30):4966-72.
40. Crown JP, Dieras V, Staroslawska E, Yardley DA, Bachelot T, Davidson N, et al. *Phase III Trial of Sunitinib in Combination With Capecitabine Versus Capecitabine Monotherapy for the Treatment of Patients With Pretreated Metastatic Breast Cancer.* **J Clin Oncol.** 2013.
41. Baselga J, Costa F, Gomez H, Hudis CA, Rapoport B, Roche H, et al. *A phase 3 trial comparing capecitabine in combination with Sorafenib or placebo for treatment of locally advanced or metastatic HER2-Negative breast Cancer (the RESILIENCE study): study protocol for a randomized controlled trial.* **Trials.** 2013;14(1):228.
42. De Boer RH, Kotasek D, White S, Koczwara B, Mainwaring P, Chan A, et al. *Phase 1b dose-finding study of motesanib with docetaxel or paclitaxel in patients with metastatic breast cancer.* **Breast Cancer Res Treat.** 2012;135(1):241-52.
43. Rugo HS, Stopeck AT, Joy AA, Chan S, Verma S, Lluch A, et al. *Randomized, placebo-controlled, double-blind, phase II study of axitinib plus docetaxel versus docetaxel plus placebo in patients with metastatic breast cancer.* **J Clin Oncol.** 2011;29(18):2459-65.
44. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. *In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship.* **Clin Cancer Res.** 2003;9(1):327-37.
45. Conte P, Guarneri V. *The next generation of biologic agents: therapeutic role in relation to existing therapies in metastatic breast cancer.* **Clin Breast Cancer.** 2012;12(3):157-66.
46. Polverino A, Coxon A, Starnes C, Diaz Z, DeMelfi T, Wang L, et al. *AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts.* **Cancer Res.** 2006;66(17):8715-21.
47. Hu-Lowe DD, Zou HY, Grazzini ML, Hallin ME, Wickman GR, Amundson K, et al. *Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3.* **Clin Cancer Res.** 2008;14(22):7272-83.
48. Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. *AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer.* **Cancer research.** 2005;65(10):4389-400.

49. Brave SR, Ratcliffe K, Wilson Z, James NH, Ashton S, Wainwright A, et al. *Assessing the activity of cediranib, a VEGFR-2/3 tyrosine kinase inhibitor, against VEGFR-1 and members of the structurally related PDGFR family.* **Mol Cancer Ther.** 2011;10(5):861-73.
50. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, et al. *Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma.* **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.** 2010;28(17):2817-23.
51. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, et al. *AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients.* **Cancer Cell.** 2007;11(1):83-95.
52. Kamoun WS, Ley CD, Farrar CT, Duyverman AM, Lahdenranta J, Lacorre DA, et al. *Edema control by cediranib, a vascular endothelial growth factor receptor-targeted kinase inhibitor, prolongs survival despite persistent brain tumor growth in mice.* **J Clin Oncol.** 2009;27(15):2542-52.
53. Backer MV, Backer JM. *Imaging key biomarkers of tumor angiogenesis.* **Theranostics.** 2012;2(5):502-15.
54. Dreys J, Siegert P, Medinger M, Mross K, Strecker R, Zirrgiebel U, et al. *Phase I clinical study of AZD2171, an oral vascular endothelial growth factor signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors.* **J Clin Oncol.** 2007;25(21):3045-54.
55. Goss GD, Arnold A, Shepherd FA, Dediu M, Ciuleanu TE, Fenton D, et al. *Randomized, double-blind trial of carboplatin and paclitaxel with either daily oral cediranib or placebo in advanced non-small-cell lung cancer: NCIC clinical trials group BR24 study.* **J Clin Oncol.** 2010;28(1):49-55.
56. Matulonis UA, Berlin S, Ivy P, Tyburski K, Krasner C, Zarwan C, et al. *Cediranib, an oral inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor kinases, is an active drug in recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer.* **J Clin Oncol.** 2009;27(33):5601-6.
57. Ulahannan SV, Brahmer JR. *Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.* **Cancer investigation.** 2011;29(4):325-37.
58. Wozniak A. *Challenges in the current antiangiogenic treatment paradigm for patients with non-small cell lung cancer.* **Critical reviews in oncology/hematology.** 2011.
59. Ballas MS, Chachoua A. *Rationale for targeting VEGF, FGF, and PDGF for the treatment of NSCLC.* **OncoTargets and therapy.** 2011;4:43-58.

60. Dahut WL, Madan RA, Karakunnel JJ, Adelberg D, Gulley JL, Turkbey IB, et al. *Phase II clinical trial of cediranib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer*. **BJU Int**. 2013.
61. Kendrew J, Odedra R, Logie A, Taylor PJ, Pearsall S, Ogilvie DJ, et al. *Anti-tumour and anti-vascular effects of cediranib (AZD2171) alone and in combination with other anti-tumour therapies*. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2013;71(4):1021-32.
62. Miller KD, Miller M, Mehrotra S, Agarwal B, Mock BH, Zheng QH, et al. *A physiologic imaging pilot study of breast cancer treated with AZD2171*. **Clin Cancer Res**. 2006;12(1):281-8.
63. Rousseau S, Houle F, Huot J. *Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells*. **Trends in cardiovascular medicine**. 2000;10(8):321-7.
64. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. *Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro*. **Microvascular research**. 1998;55(1):29-42.
65. Bergers G, Hanahan D. *Modes of resistance to anti-angiogenic therapy*. **Nat Rev Cancer**. 2008;8(8):592-603.
66. Crawford Y, Ferrara N. *Tumor and stromal pathways mediating refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies*. **Trends Pharmacol Sci**. 2009;30(12):624-30.
67. Ebos JM, Kerbel RS. *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2011;8(4):210-21.
68. Schneider BP, Sledge GW, Jr. *Anti-vascular endothelial growth factor therapy for breast cancer: can we pick the winners?* **J Clin Oncol**. 2011;29(18):2444-7.
69. Gong C, Yao Y, Wang Y, Liu B, Wu W, Chen J, et al. *Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer*. **J Biol Chem**. 2011;286(21):19127-37.
70. Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU, et al. *Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients*. **Cancer**. 2012;118(10):2603-14.
71. Calin GA, Croce CM. *MicroRNA signatures in human cancers*. **Nature Reviews Cancer**. 2006(6):857-66.
72. He L, Hannon GJ. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. **Nature Reviews Genetics**. 2004(5):522-31.

73. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. *Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression*. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**. 2006;17(3):189-202.
74. Hwang HW, Mendell JT. *MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis*. **British journal of cancer**. 2006;94(6):776-80.
75. Kent OA, Mendell JT. *A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes*. **Oncogene**. 2006;25(46):6188-96.
76. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. **Nature**. 2007;449(7163):682-8.
77. Wang V, Wu W. *MicroRNA: A New Player in Breast Cancer Development* **Journal of Cancer Molecules**. 2007;3(5):133-8.
78. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. *MicroRNAs and metastases--the neuroblastoma link*. **Cancer biology & therapy**. 2010;9(6):453-4.
79. Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. *MicroRNAs and breast cancer malignancy: An overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis*. **Cancer Biomark**. 2012;11(6):269-80.
80. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis*. **Nature cell biology**. 2008;10(2):202-10.
81. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. *Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells*. **Circ Res**. 2007;100(8):1164-73.
82. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. *MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs*. **Blood**. 2006;108(9):3068-71.
83. Kuehbachner A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. *Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis*. **Circ Res**. 2007;101(1):59-68.
84. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. *miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity*. **Dev Cell**. 2008;15(2):272-84.
85. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. *The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis*. **Dev Cell**. 2008;15(2):261-71.
86. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, et al. *Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126*. **Development**. 2008;135(24):3989-93.

87. Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. *MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007;104(51):20350-5.
88. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. *A microRNA component of the hypoxic response.* **Cell death and differentiation.** 2008;15(4):667-71.
89. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, et al. *MirNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia.* **PLoS one.** 2006;1:e116.
90. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. *MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression.* **PLoS one.** 2011;6(4):e19139.
91. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, et al. *Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines.* **Cancer Res.** 2007;67(6):2456-68.
92. Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. *MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer.* **Clin Epigenetics.** 2011;2(2):171-85.
93. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytskyy Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, et al. *Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin.* **Mol Cancer Ther.** 2008;7(7):2152-9.
94. Liang Z, Wu H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, et al. *Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1.* **Biochem Pharmacol.** 2010;79(6):817-24.
95. Yokoi T, Nakajima M. *microRNAs as mediators of drug toxicity.* **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2013;53:377-400.
96. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. *Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin.* **Int J Cancer.** 2010;127(8):1785-94.
97. Chen PS, Su JL, Hung MC. *Dysregulation of microRNAs in cancer.* **J Biomed Sci.** 2006;19:90.
98. Kopp F, Oak PS, Wagner E, Roidl A. *miR-200c sensitizes breast cancer cells to doxorubicin treatment by decreasing TrkB and Bmi1 expression.* **PLoS One.** 2012;7(11):e50469.
99. Cochrane DR, Howe EN, Spoelstra NS, Richer JK. *Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers.* **J Oncol.** 2010;2010:821717.

100. Garofalo M, Croce CM. *MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance*. **Drug Resist Updat**. 2013.
101. Li XJ, Ji MH, Zhong SL, Zha QB, Xu JJ, Zhao JH, et al. *MicroRNA-34a modulates chemosensitivity of breast cancer cells to adriamycin by targeting Notch1*. **Arch Med Res**. 2012;43(7):514-21.
102. Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Kublbeck M, Pawitan Y, Hielscher T, et al. *Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer*. **Oncogene**. 2013;32(9):1173-82.
103. Panda H, Chuang TD, Luo X, Chegini N. *Endometrial miR-181a and miR-98 expression is altered during transition from normal into cancerous state and target PGR, PGRMC1, CYP19A1, DDX3X, and TIMP3*. **J Clin Endocrinol Metab**. 2012;97(7):E1316-26.
104. Shibahara Y, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Chan MS, Yiu CC, et al. *Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1*. **J Pathol**. 2012;227(3):357-66.
105. Chen F, Chen C, Yang S, Gong W, Wang Y, Cianflone K, et al. *Let-7b inhibits human cancer phenotype by targeting cytochrome P450 epoxygenase 2J2*. **PLoS One**. 2012;7(6):e39197.
106. Zhang Y, Gao JS, Tang X, Tucker LD, Quesenberry P, Rigoutsos I, et al. *MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene*. **FEBS Lett**. 2009;583(22):3725-30.
107. Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, et al. *Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer*. **PLoS One**. 2012;7(4):e34210.
108. Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K, Takahashi RU, Takeshita F, Taya T, et al. *An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells*. **Mol Cancer**. 2011;10:135.
109. Miyamoto KI, Koga-Takeda K, Koga K, Ohshima T, Nomura M. *Saturable function of P-glycoprotein as a drug-efflux pump in multidrug-resistant tumour cells*. **J Pharm Pharmacol**. 1996;48(5):522-5.
110. Mota AL, Marques MM, Vendrame CB. *Caracterização fenotípica de linhagens celulares de carcinoma mamário humano por imunocitoquímica e imunohistoquímica*. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**. São José do Rio Preto: Universidade Paulista; 2012.
111. Bengtsson H, Hossjer O. *Methodological study of affine transformations of gene expression data with proposed robust non-parametric multi-dimensional normalization method*. **BMC Bioinformatics**. 2006;7:100.

112. Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J. *RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis*. **Bioinformatics**. 2006;22(22):2825-7.
113. Jeffery IB, Higgins DG, Culhane AC. *Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data*. **BMC Bioinformatics**. 2006;7:359.
114. Martinho O, Silva-Oliveira R, Miranda-Goncalves V, Clara C, Almeida JR, Carvalho AL, et al. *In Vitro and In Vivo Analysis of RTK Inhibitor Efficacy and Identification of Its Novel Targets in Glioblastomas*. **Transl Oncol**. 2013;6(2):187-96.
115. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, et al. *Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma*. **J Clin Oncol**. 2010;28(17):2817-23.
116. Seitz S, Schally AV, Papadia A, Glueck S, Calfa C, Ortmann O, Buchholz S. *Effective tumor growth inhibition of MX1 and MDA-MB-231 estrogen receptor negative human breast cancer xenografts by treatment with LHRH antagonist cetorelix*. **Cancer Res**. 2009;69: 2137
117. van Horssen R, Hollestelle A, Rens JA, Eggermont AM, Schutte M, Ten Hagen TL. *E-cadherin promoter methylation and mutation are inversely related to motility capacity of breast cancer cells*. **Breast Cancer Res Treat**. 2012;136(2):365-77.
118. Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER. *Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines*. **Oncogene**. 1995;11(7):1319-26.
119. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. *Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition*. **Breast Cancer Res**. 2011;13(3):211.
120. Druz A, Chen YC, Guha R, Betenbaugh M, Martin SE, Shiloach J. *Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines*. **RNA Biol**. 2013;10(2):287-300.
121. Nagalla S, Chou JW, Willingham MC, Ruiz J, Vaughn JP, Dubey P, et al. *Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis*. **Genome Biol**. 2013;14(4):R34.
122. Liu Y, Lai L, Chen Q, Song Y, Xu S, Ma F, et al. *MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN*. **J Immunol**. 2012;188(11):5500-10.
123. Wang HJ, Guo YQ, Tan G, Dong L, Cheng L, Li KJ, et al. *MiR-125b regulates side population in breast cancer and confers a chemoresistant phenotype*. **J Cell Biochem**. 2013.

124. Kim WK, Park M, Kim YK, Tae YK, Yang HK, Lee JM, et al. *MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation.* **Clin Cancer Res.** 2011;17(24):7584-94.
125. Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, et al. *MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma.* **Int J Cancer.** 2008;123(12):2791-7.
126. Haga CL, Phinney DG. *MicroRNAs in the imprinted DLK1-DIO3 region repress the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the TWIST1 protein signaling network.* **J Biol Chem.** 2012;287(51):42695-707.
127. Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y, et al. *MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression.* **J Biol Chem.** 2010;285(28):21496-507.
128. Cao J, Song Y, Bi N, Shen J, Liu W, Fan J, et al. *DNA methylation-mediated repression of miR-886-3p predicts poor outcome of human small cell lung cancer.* **Cancer Res.** 2013;73(11):3326-35.
129. Xiong Y, Zhang L, Holloway AK, Wu X, Su L, Kebebew E. *MIR-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer.* **PLoS One.** 2011;6(10):e24717.
130. Jeon SH, Johnson BH, Lee YS. *A tumor surveillance model: a non-coding RNA senses neoplastic cells and its protein partner signals cell death.* **Int J Mol Sci.** 2012;13(10):13134-9.
131. Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, et al. *miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A.* **Genes Dev.** 2009;23(20):2388-93.