

Augusto Ludvik Filip Marino

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MICRORNAS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS POR *MICROARRAYS***

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Barretos, SP
2013

Augusto Ludvik Filip Marino

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MICRORNAS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS POR *MICROARRAYS***

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Barretos, SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Marcos Davidson Muniz Fernandes
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

M339a Marino, Augusto Ludvik Filip.
Análise do perfil de expressão diferencial de microRNAs em
carcinomas mamários por microarrays. / Augusto Ludvik Filip
Marino. - Barretos, SP 2013.
134 f. : il.

Orientadora: Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira.

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

1. Biomarcadores. 2. MicroRNAs. 3. Câncer de mama. 4.
Metástase 5. *Microarrays*. I. Autor. II. Silveira, Márcia Maria
Chiquitelli Marques. III. Título.

CDD 616.99449

FOLHA DE APROVAÇÃO

Augusto Ludvik Filip Marino

Análise do perfil de expressão diferencial de microRNAs em carcinomas mamários por microarrays

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: 18/07/2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani
Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto
Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior
Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Prof.^a Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira
Orientadora
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). E de bolsa de mestrado (processo número - 2011/13961-3).

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,
Francisco e Miriam,
meus maiores mentores,
e benção constante em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me capacitado e sustentado para vencer mais esta etapa.

Aos meus pais Francisco e Miriam, pela inspiração, amor incondicional e por me apoiarem desde sempre, confiando e torcendo incessantemente. **Aos meus irmãos Francisco e Lilian e minha avó Iná**, por nunca duvidarem de mim.

À minha orientadora Dra Márcia Marques Silveira pela oportunidade, incentivo e paciência, orientação e ensinamentos, e por acreditar que eu seria capaz.

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 Dr. André Carvalho e ao coordenador do CPOM Dr. Rui Reis**.

Ao professor Dr. Jeremy Squire pela oportunidade e disposição para que um intercâmbio paralelo a este projeto acontecesse na Queen's University.

A todos os **pesquisadores do CPOM e IEP**, por compartilharem um pouco de sua experiência e contribuírem para meu crescimento profissional e científico.

À Dra. Adriane Feijó, pela amizade, histórias inacreditáveis, ensinamentos e habilidades impressionantes de informática, e contribuição muito significativa neste trabalho.

Às amigas de equipe Ana Laura e Taciane, pela amizade, ajuda, discussões, incentivos e filosofias de vida. Agradeço também pelos suplementos nutricionais mágicos, por me fazerem rir nos dias mais soturnos, e pela oportunidade de ter convivido este tempo com vocês.

Agradeço pela companhia e convivência com **todos os alunos e funcionários do CPOM** (Renato, Adriana, Adriana Lorenzi, Abel, Matias, Lídia, Alessandra, Natália, Aline, Letícia, Rodolfo, Flávia, Nathália, Viviane, Marcela, André), em especial a **Fernanda Cury**, por compartilharmos tantas risadas, **à Letícia Yamane**, por estarmos juntos nesta jornada do início ao fim e **ao amigo Maicon Zannon**, por tantas vezes me influenciar com seu bom humor e perseverança na busca de seus objetivos.

À Vivian Diamantino, pela amizade antiga, e por me socorrer em momentos de desespero.

Aos amigos de longa data (Kelly, Felipe, Vitor, Ana Carolina), pela compreensão de minha ausência nos encontros da turma.

Aos amigos da faculdade (Dérick, Luís Guilherme, Camila, Gabriela, Cárol, Priscila, Cleiton, Marcus, Fabiano, Daniel, Fernanda) minha segunda família sempre comigo, apesar da distância física.

Ao Dr. René Vieira pela análise clínica, suporte e esforço no levantamento da casuística e desenvolvimento deste projeto.

Ao departamento de patologia do hospital de Câncer de Barretos, **em especial ao Dr. Cristovam Scapulatempo**, pela disponibilização de todo material necessário à pesquisa e contribuições nas bancas de acompanhamento; **e à Dra Lígia Maria Kerr**, pela revisão cuidadosa de todos os casos deste projeto.

À Fabiana e Patrícia do arquivo de material pela dedicação na busca de casos antigos e corte dos blocos, **aos técnicos** da imunohistoquímica **Guilherme Ribeiro e Eloísa Helena** pela ajuda com as marcações padronizadas nas máquinas, **aos funcionários do registro, Rafael e Estela** pelo auxílio no levantamento da casuística, **aos funcionários do SAME Tiago, Vinícius, Bruno e Emerson**, pela paciência e eficiência na busca de prontuários semi-ativos. **À Allini, Rosana, Geisa, Cleyton e Dr. José Humberto do NAP**, pelo apoio estatístico. **À Silvana e Brenda** da Pós-graduação pela dedicação e competência em ajudar os alunos, **à Marcella** pela competência na supervisão dos processos Fapesp.

Em geral, aos departamentos NAP, EPIT, SAME, PATOLOGIA e CPOM que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fapesp pelo auxílio financeiro do projeto (processo 2010/16796-0) e da bolsa de mestrado (processo 2011/13961-3).

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, críticas e sugestões.

A todos os pacientes que contribuíram com este estudo,

Aos colegas de pós-graduação, por partilharem do mesmo objetivo,

Aos amigos e familiares pelo entusiasmo e presença em minha vida.

À todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

"Uma longa viagem começa com um único passo."

Lao Tsé

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Desenvolvimento do câncer de mama	02
1.2	Angiogênese, invasão e metástase tumoral	04
1.3	Regulação pós-transcricional exercida por microRNAs	09
1.4	MicroRNAs como biomarcadores de metástase no câncer de mama	11
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	15
3	OBJETIVOS	17
	Objetivo Geral	18
	Objetivos específicos	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Delineamento do estudo	20
4.1.1	Aspecto ético	20
4.1.2	Critérios de inclusão	20
4.1.3	Critérios de exclusão	20
4.1.4	Casuística e organização dos grupos de pacientes	20
4.1.5	Variáveis clínicas e patológicas	23
4.2	Extração e quantificação de RNA total	25
4.2.1	Extração de RNA das amostras parafinadas	25
4.2.2	Avaliação da quantidade e qualidade de RNA	26
4.3	Oligo <i>microarrays</i>	28
4.3.1	MicroRNA <i>microarrays</i>	28
4.3.2	Análise dos dados de <i>microarrays</i>	30
4.4	Busca de microRNAs biomarcadores de metástase pelo método da curva ROC	31
4.5	Reação de PCR em tempo real para confirmação dos dados de <i>microarrays</i>	32
4.6	Análise dos dados de PCR quantitativa em tempo real	33
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
6	RESULTADOS	37

6.1	Dados clínicos	38
6.2	Avaliação da Qualidade e Integridade das Amostras de RNA	38
6.3	Assinaturas de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos durante a progressão do câncer de mama	39
6.4	Interpolação dos miRNAs diferencialmente expressos durante a progressão tumoral por meio da construção de um diagrama de Venn	46
6.5	Busca de microRNAs biomarcadores de metástase na progressão do câncer de mama, pelo método da Curva ROC	47
6.6	Confirmação dos miRNAs apontados como diferencialmente expressos por qPCR em Tempo Real	50
6.7	Associação dos padrões de expressão dos miRNAs com o prognóstico dos pacientes com câncer de mama durante a progressão tumoral	52
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ANEXOS	77
	Anexo A - Ficha de Coleta de prontuário	77
	Anexo B - Aprovação pelo comitê de ética	80
	Anexo C - Submissão de artigo para revista	81
	Anexo D - Artigo científico oriundo desta dissertação	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação histológica dos subtipos de carcinoma mamário, categorizando a heterogeneidade baseada nas características arquiteturais e padrões de crescimento	03
Figura 2 -	Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. Modelo moderno que apresenta os quatro subtipos bem conhecidos (<i>Basal-like</i> ; Her2 superexpresso; Luminal A e B) e os dois mais novos ainda discutidos na literatura (<i>claudin-low e normal-like</i>)	04
Figura 3 -	Progressão metastática do câncer de mama	08
Figura 4 -	Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs	10
Figura 5 -	Fluxograma para preparação dos RNA Small Chip utilizando o equipamento <i>Bioanalyzer 2100 Agilent</i> , para avaliação das amostras de RNA total	28
Figura 6 -	<i>Agilent microarrays</i> no formato 8x15K oligonucleotídeos sintetizada a partir de sequências de microRNAs	29
Figura 7 -	Imagem típica de um eletroferograma obtido a partir da análise da integridade de uma das amostras de RNA total deste projeto	39
Figura 8 -	Matriz de expressão de 12 microRNAs diferencialmente expressos no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama sem metástase e com metástase no ECI	40
Figura 9 -	Matriz de expressão de 43 microRNAs diferencialmente expressos no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama sem metástase e com metástase no ECII	41
Figura 10 -	Matriz de expressão de 67 microRNAs diferencialmente expressos no	42

tecido tumoral de pacientes com câncer de mama sem metástase e com metástase no ECIII

- Figura 11 -** Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de miRNAs apontados como diferencialmente expressos nas análises de *microarrays*. Podemos identificar os 7 miRNAs comuns aos três estadiamentos e os demais representam os miRNAs específicos de cada estágio e comuns a mais de um estágio 47
- Figura 12 -** Comparação dos perfis de expressão de três miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o processo de metástase tumoral em pacientes com câncer de mama estadiamento clínico I 48
- Figura 13 -** Comparação dos perfis de expressão de seis miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o processo de metástase tumoral em pacientes com câncer de mama estadiamento clínico II 49
- Figura 14 -** Comparação dos perfis de expressão de doze miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o processo de metástase tumoral em pacientes com câncer de mama estadiamento clínico III 50
- Figura 15 -** Confirmação da superexpressão de miR-183 e miR-494 nas amostras de tumores de mama metastáticos (M) em relação aos não metastáticos (NM) nos estadiamentos clínicos II e I, respectivamente (A e B) 51
- Figura 16 -** Curvas ROC obtidas a partir dos dados de expressão dos miRNAs miR-21, miR-183 e miR-494 diferencialmente expressos nas amostras de tumor metastático de pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II 53
- Figura 17 -** Curva ROC obtida a partir da combinação dos dados de expressão dos miRNAs miR-21, miR-183 e miR-494 diferencialmente expressos nas amostras de tumor metastático de pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II 54

- Figura 18 -** Curvas de risco relativo associando o padrão de expressão (*up* = linha tracejada/*down* = linha contínua) do miR-21, miR-183 e do miR-494 com a presença de metástase em pacientes com carcinoma mamário invasor estágio II 55
- Figura 19 -** Curva de risco relativo associando o padrão de expressão (*up* = linha tracejada/*down* = linha contínua) combinado dos três miRNAs (miR-21, miR-183 miR-494) com a presença de metástase em pacientes com carcinoma mamário invasor estágio II 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Recorrência/ Metástase em função do estágio clínico ao início do tratamento. Hospital de Câncer de Barretos. Período de 1998 a 2001	21
Tabela 2 -	Análise da distribuição das variáveis categóricas entre os grupos com presença ou ausência de metástase à distância.	22
Tabela 3 -	Análise da distribuição das variáveis contínuas entre os com presença ou ausência de metástase à distância.	22
Tabela 4 -	Relação dos marcadores utilizados na técnica de imunohistoquímica	24
Tabela 5 -	Classificação molecular baseada na expressão de marcadores pela imunohistoquímica	24
Tabela 6 -	Sondas utilizadas nas reações de qRT-PCR e suas respectivas sequências.	33
Tabela 7 -	Análise da distribuição das variáveis categóricas entre os grupos em relação aos subtipos moleculares	38
Tabela 8 -	Modulação dos miRNAs diferencialmente expressos em cada estágio clínico	43
Tabela 9 -	Tabela dos miRNAs com potencial biomarcador apresentando os valores de corte obtidos por meio das análises de curvas ROC.	54
Tabela 10 -	Análise multivariada para risco relativo utilizando regressão de Cox para combinar variáveis clínicas com a modulação de três miRNAs de interesse (hsa-miR21, hsa-miR494 e hsa-miR-183)	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC	Área sob a curva (<i>area under curve</i>)
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CIP	Fosfatase de intestino de cabra (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
Cy ³	Cianina 3
DISH	<i>Dual in situ hybridization</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Estádio clínico
ECM	Estádio clínico de paciente que desenvolveu metástase à distância
EMT	Transição epitélio-mesenquimal (<i>epithelial mesenchymal transition</i>)
g	Gravidade (unidade de rotação em centrífuga)
HER2	Receptor de fator de crescimento humano 2 (<i>Human growth factor receptor 2</i>)
HIF	Fator indutor de hipóxia (<i>hypoxia inducible factor</i>)
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M	Metastático
mer	Unidade repetitiva de uma cadeia de polímeros
mL	Mililitro
ng	Nanograma
NM	Não metastático
Nt	Nucleotídeo
μL	Microlitro
Pfp	Probabilidade de falsos positivos
PTEN	Gene Fosfatase homóloga a tensina (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RE	Receptor estrógeno
RP	Receptor progesterona
RPM	Rotações por minuto
TMA	Microarranjo de tecido (<i>Tissue microarray</i>)
TNM	Sistema TNM de classificação de tumores
UTR	Região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
β	Beta
μ	Micro
κ	kappa
>	Maior que
≥	maior ou igual a
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
%	Porcentagem
+	Mais
+	Positivo (sinal sobrescrito)
-	menos
-	Negativo (sinal sobrescrito)

RESUMO

Marino, ALF. Análise do perfil de expressão diferencial de microRNAs em carcinomas mamários por *microarrays*. **Dissertação (Mestrado)**. Hospital de Câncer de Barretos, Barretos; 2013.

JUSTIFICATIVA: MicroRNAs (miRNAs) regulam negativamente a expressão gênica e alterações na sua expressão estão comumente associadas ao surgimento e progressão do câncer de mama. Uma vez que miRNAs podem atuar tanto como supressores quanto promotores de metástases, dependendo de seus RNAs alvos, nossa hipótese é que existem determinados miRNAs que apresentam níveis de expressão diferenciados em tumores de mama potencialmente metastáticos. **OBJETIVO:** Avaliar o perfil de expressão diferencial de miRNAs envolvidos na progressão do câncer de mama, particularmente no processo de metástase. **MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo de coorte retrospectivo constituído de pacientes admitidos no Hospital de Câncer de Barretos, sem tratamento prévio, diagnosticados com câncer de mama ductal ou lobular nos estádios clínicos (EC) I, II e III. As amostras foram categorizadas em dois grupos: 1) pacientes que desenvolveram metástase a distância ao longo do tempo e 2) pacientes que não desenvolveram metástase a distância ao longo do tempo. Foi realizado rastreamento de miRNAs pela tecnologia de *microarray* em 64 pacientes, e confirmação por qRT-PCR de alguns miRNAs com potencial de biomarcadores de metástase. Os dados moleculares foram correlacionados com os dados clínicos obtidos a partir dos prontuários. **RESULTADOS:** A análise do perfil de expressão dos miRNAs por *microarrays* apontou diversos miRNAs comuns a todos os estádios clínicos e associados a eventos importantes da progressão como invasão local (miR-21) e colonização metastática (família let-7). Foi possível confirmar a superexpressão do miR-183 e do miR-494 pela técnica de qRT-PCR nos casos metastáticos de câncer de mama em EC II e EC I respectivamente. Tais miRNAs atuam como importantes reguladores de genes supressores tumorais e também estão envolvidos com os processos de invasão e transição epitélio-mesenquimal (EMT). Estes miRNAs tiveram seu padrão de expressão associado a um pior prognóstico uma vez que a superexpressão de miR-183 e miR-494 foi estatisticamente significativa nos casos metastáticos do estadiamento clínico II. **CONCLUSÕES:** A análise da expressão diferencial por *microarrays* apontou vários miRNAs associados ao processo de metástase em pacientes com câncer de mama. Dentre eles destacamos a superexpressão de

miR-183 e miR-494, que foi associada a um pior prognóstico, sugerindo que estes miRNAs sejam utilizados como biomarcadores de risco para e metástase do câncer de mama particularmente no EC II.

PALAVRAS-CHAVE: microRNAs; câncer de mama; metástase; *microarrays* biomarcadores, perfil de expressão diferencial.

ABSTRACT

MARINO, ALF. Analysis of differential expression profile of microRNAs in breast carcinomas by microarrays. 2013. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos Cancer Hospital, Barretos, 2013.

BACKGROUND: MicroRNAs (miRNAs) negatively regulate gene expression and are often deregulated in breast cancer progression. Considering that miRNAs can act as either suppressors or promoters of metastasis, depending on their mRNA targets, we hypothesize that some miRNAs might be differentially expressed in potentially metastatic breast tumours. **AIM:** To evaluate the differential expression profile of miRNAs involved in breast cancer progression, particularly in metastasis. **PATIENTS AND METHODS:** Retrospective cohort study consisting of patients admitted to the Barretos Cancer Hospital, without previous treatment, diagnosed with ductal or lobular breast cancer in clinical stages (CS) I, II, III. The specimens were categorized in two groups: 1) patients who developed distant metastasis over time and 2) those that did not. We performed miRNA screening using samples collected from 64 patients, and confirmed selected miRNAs by qRT-PCR based on their potential as metastatic biomarkers. The molecular data was correlated with clinical data gathered from patient records. **RESULTS:** The expression profiling revealed several miRNAs common to all clinical stages and associated with important events of progression, such as local invasion (miR-21) and metastatic colonization (let-7 family). We confirmed the upregulation of miR-183 and miR-494 with real time qRT-PCR in breast cancer metastatic cases in clinical stages II and I respectively. Those miRNAs are important regulators of tumour suppressor genes and are also involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion processes. When assessing survival outcome by correlating clinical and molecular data, the combination of miRNAs 183 and 494 was associated with worse prognosis with statistical significance for the CSII metastatic cases. **CONCLUSIONS:** Through differential expression profiling, several miRNAs were indicated as important regulators during the metastatic progression of breast cancer. Among them, miR-183 and miR-494 were revealed as potential biomarkers for breast cancer progression, particularly in CS II, showing that elevated expression levels were associated with poor outcome.

KEYWORDS: microRNAs; breast cancer; metastasis; microarrays; biomarkers, differential expression profile.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento do câncer de mama

Segundo tipo mais frequente no mundo, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de 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 casos novos por 100 mil (1).

O câncer de mama se desenvolve a partir de alterações genético-moleculares nas células do tecido mamário não sendo considerado como uma única doença, dado ao seu alto padrão de heterogeneidade clínica e molecular (2,3). De modo geral, o carcinoma mamário pode ser dividido em carcinoma *in situ* e carcinoma infiltrativo ou invasivo. O carcinoma *in situ* ainda é dividido em ductal e lobular, dependendo dos padrões de crescimento e características citológicas, sendo o tipo ductal predominante (4,5). Baseando-se na arquitetura do tumor, o carcinoma ductal ainda pode ser subdividido em cinco classes reconhecidas: comedocarcinoma, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido.

De maneira semelhante aos carcinomas *in situ*, o tipo invasivo abrange um grupo heterogêneo de tumores, sendo os tipos mais frequentes: ductal invasivo (70-80% de todas as lesões) e lobular invasivo (10-15% de todas as lesões) (6), que constituem o foco deste trabalho, existindo ainda outros tipos menos frequentes, sendo os principais apresentados na **Figura 1**.

Na prática clínica, o carcinoma ductal invasivo (CDI) ainda é classificado em: bem diferenciado (grau 1), moderadamente diferenciado (grau 2) ou pouco diferenciado (grau 3), com base nos níveis de pleomorfismo nuclear, formação glandular e tubular e índice mitótico (7). Por fim, utilizam-se ainda marcadores moleculares, que auxiliam na estratificação dos pacientes, em relação ao risco relativo de recorrência e progressão, direcionamento do tratamento e resposta a fármacos. Estes marcadores são: receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), HER2/neu, e o Ki-67 (8,9) já incorporados à rotina de avaliação patológica. O status desses marcadores ajuda a direcionar o tipo de terapia mais adequado. Por exemplo: aplicação de tamoxifeno ou inibidores de aromatase,

que são empregados em pacientes RE⁺/RP⁺, enquanto trastuzumab ou lapatinib são utilizados para HER2/neu⁺, demonstrando o potencial de biomarcadores moleculares no auxílio das decisões clínicas (10).

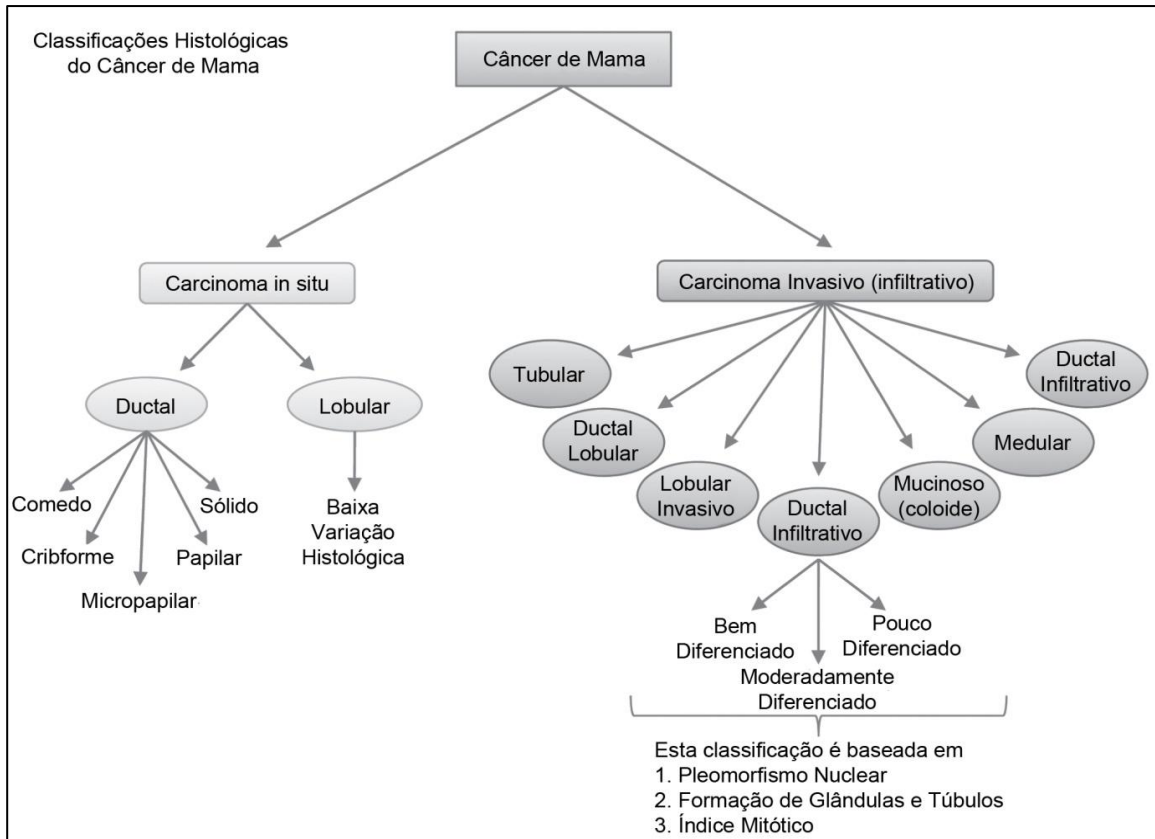


Figura 1 - Classificação histológica dos subtipos de carcinoma mamário, categorizando a heterogeneidade baseada nas características arquiteturais e padrões de crescimento. Adaptado de Malhotra *et al* 2010(4).

Do ponto de vista molecular as neoplasias da mama podem ser classificadas em seis subtipos: tumores basais (*basal like* ou triplo negativo; luminal A, luminal B; Her2 superexpresso (*Her2 overexpress*), e o tipo *normal-like*, sendo mais recentemente descrito o *claudin-low*, sendo os dois últimos ainda alvo de intensa discussão (2,3,11,12).

Esta classificação molecular foi possível por meio da avaliação simultânea de milhares de genes, baseando-se na investigação sistemática dos chamados perfis de expressão gênica, fundamentados na expressão dos RNAs mensageiros dos tumores de mama por meio da tecnologia de *microarrays* (Figura 2).

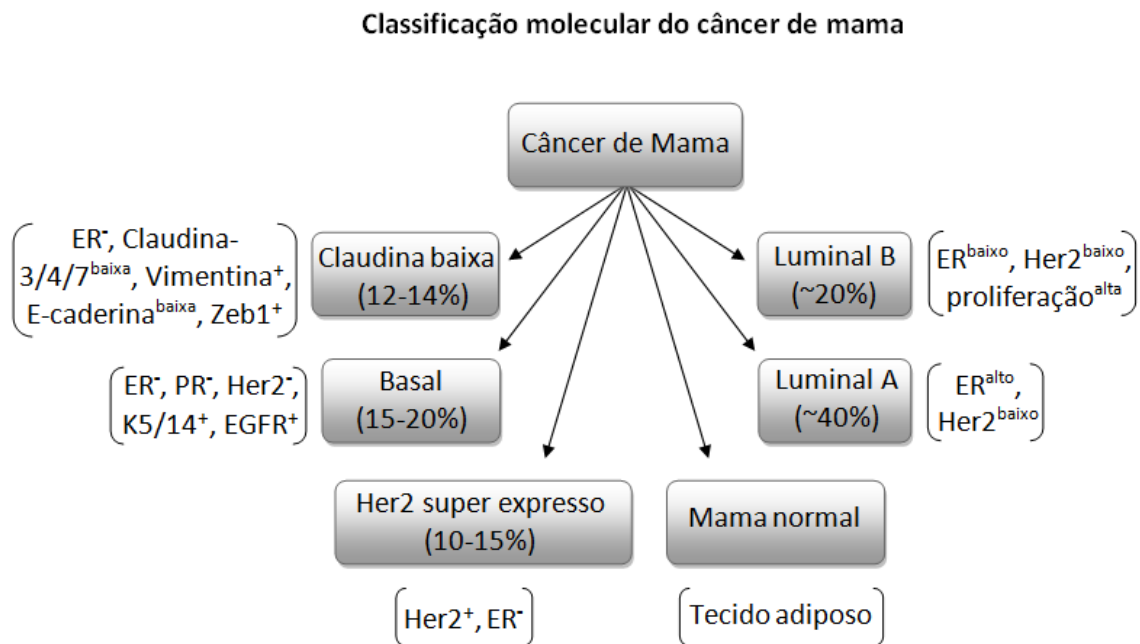


Figura 2 - Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. Modelo moderno que apresenta os quatro subtipos bem conhecidos (*Basal-like*; Her2 superexpresso; Luminal A e B) e os dois mais novos ainda discutidos na literatura (*claudin-low* e *normal-like*). Adaptado de Malhotra *et al* 2010 (4).

Estes subtipos notoriamente apresentam diferenças significativas na predição de sobrevida e sobrevida livre de doença sendo o tipo basal de pior prognóstico seguido do tipo Her2 superexpresso (12,13).

Devido a dificuldades relacionadas ao custo, procurou-se comparar o perfil molecular com a expressão de proteínas, através do exame de imunohistoquímica. Apesar da correlação não ser perfeita, houve a publicação de diversos trabalhos, visando propor uma melhor correlação clínico-molecular, sendo que em 2011, baseado na imunohistoquímica, definiu-se os luminais B, separando-os em: luminal B1, que apresenta marcação positiva para receptores de estrógeno e progesterona; marcação negativa para Her2 e alto índice de proliferação identificado através de forte marcação da proteína nuclear Ki67; e luminal B2, que apresenta marcação positiva para receptores de estrógeno, progesterona, marcação positiva para Her2, independente da intensidade de marcação de Ki 67 (9).

1.2 Angiogênese, invasão e metástase tumoral

Um problema frequente no diagnóstico de tumores de mama é a falta de marcadores biológicos associados à invasão e metástase tumoral. Sabemos que o processo de formação de novos vasos, denominado angiogênese, constitui um importante mecanismo no desenvolvimento tumoral, sendo responsável pelo aporte nutricional às células neoplásicas em proliferação e estabelecendo condições favoráveis para a disseminação metastática (14).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha papel chave na angiogênese tumoral, estimulando a proliferação, migração e sobrevivência celular das células endoteliais (15). O mecanismo de atuação do VEGF ocorre por meio da ligação aos receptores tirosina quinase específicos: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e VEGFR-3. Sabe-se que o aumento da expressão do VEGF e seus receptores têm sido associados à progressão, metástase e pior prognóstico em diversos tumores malignos (16).

Por outro lado, a angiogênese também é regulada por fatores antiangiogênicos como angiostatina, endostatina e algumas citocinas como CXCL4, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 que podem inibir a angiogênese (17). A superexpressão de fatores angiogênicos em neoplasias malignas humanas tem sido previamente descrita como, por exemplo, a do VEGF-A em carcinomas de pulmão, mama e do pâncreas (18,19) além de angiopoietina (ANG)-1 e ANG-2 em carcinomas gástricos e hepatocelular (20).

Juntamente com sua habilidade em induzir a angiogênese, as neoplasias malignas também podem induzir a formação de novos vasos linfáticos, um processo referido como linfangiogênese (21) que é principalmente estimulada por VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A, HGF bem como membros da família FGF.

O estudo do processo de linfangiogênese, ou seja, crescimento e produção de novos vasos linfáticos sob vários aspectos fisiológicos e patológicos ganhou um maior interesse nos últimos anos. Atualmente, não há um consenso se a principal via de disseminação linfática é através do desenvolvimento de vasos intratumorais ou peritumorais (22,23). Assim, a elucidação dos mecanismos que governam o processo de linfangiogênese é essencial para se entender como ocorre o desenvolvimento dos vasos linfáticos, bem como para encontrar marcadores específicos para eles.

Membros da família VEGF estão intimamente relacionados com a proliferação de vasos linfáticos. A linfangiogênese é vastamente dependente da sinalização via VEGFC e da atividade do receptor VEGFR3 (24). Outra molécula envolvida neste processo é a

Podoplanina, uma glicoproteína transmembrana, que pode contribuir para adesão das células endoteliais linfáticas, migração e formação de conexões linfáticas (25).

Nos últimos anos marcadores específicos de células do endotélio linfático tem sido descobertos, como o anti-LYVE-1 (26), anti-Prox1 (27), anti-VEGFR3, anti-podoplanin (22) e D2-40 (28). Recentemente relatou-se que o marcador D2-40 se apresenta como um marcador altamente específico para células endoteliais linfáticas, não se mostrando expresso em células endoteliais de vasos sanguíneos representando, portanto um importante marcador para identificação de vasos linfáticos peritumoral e intratumoral (29).

Estudos utilizando modelos animais e dados clínico patológicos indicaram que a linfangiogênese em tumores sólidos pode contribuir para a metástase linfática (30) e que a ativação da linfangiogênese por fatores derivados de tumores pode ser de grande importância no câncer de mama em virtude das metástases que ocorrem primariamente em vasos linfáticos.

Recentemente foi demonstrada, a expressão diminuída de fatores linfangiogênicos, como VEGF-C e VEGF-D e seu respectivo receptor VEGF-R3 em tumores mamários comparados com tecido de mama normal. Além disso, outros fatores linfangiogênicos e angiogênicos como FGF-2, HGF, angiopoietina e membros da família PDGF também se mostravam “subexpressos”. Esta diminuição na produção de fatores linfangiogênicos foi acompanhada também por uma redução da quantidade de células endoteliais em amostras tumorais (31). Estes dados indicam que a linfangiogênese parece não estar aumentada em tumores mamários e sim menos ativa do que em tecidos mamários normais.

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 (FIH) 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. Sendo assim, muitos tumores capazes de superar a baixa tensão de oxigênio e induzir uma neovascularização têm sido correlacionados com pior prognóstico (32).

Outro mecanismo considerado de grande importância para a progressão tumoral é a transição epitélio-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition* - EMT), processo pelo qual as células tumorais perdem características epiteliais (perda de expressão da proteína

de adesão célula-célula como por exemplo E-caderina) e adquirem características mesenquimais tornando-as capazes de invadir tecidos vizinhos, migrar e colonizar sítios distantes. Acredita-se que este evento tem um papel fundamental em estágios iniciais da progressão do tumor metastático (33).

O processo de metástase por sua vez é um passo crucial para disseminação das neoplasias, sendo responsável por mais de 90% das mortes associadas ao câncer (34). Considerando que a maioria dos pacientes portadores de câncer morrem devido a presença de metástases e não por causa do tumor primário, é imprescindível, portanto, que os estudos avancem na elucidação dos mecanismos moleculares deste evento, de maneira a encontrar alvos terapêuticos e prevenir a disseminação do câncer (33). Acredita-se que o descontrole da proliferação epitelial e angiogênese constituem a base de iniciação e crescimento dos carcinomas primários (35,36), seguido de vários eventos importantes, que culminam com o estabelecimento do tumor metastático (**Figura 3**), onde primeiramente, as células do tumor primário devem conseguir acesso ao sistema circulatório, evento este auxiliado pela angiogênese e remodelamento da membrana basal. Tais células errantes precisam então, sobreviver às forças mecânicas da circulação, enganar o sistema imune e se direcionar para os sítios distantes de metástase. Ao chegar no local, precisam reconhecer e aderir às células endoteliais dos vasos e degradar a matriz e, por fim, precisam invadir o tecido secundário e reestabelecer um crescimento ordenado de uma massa tumoral secundária.(33,36).

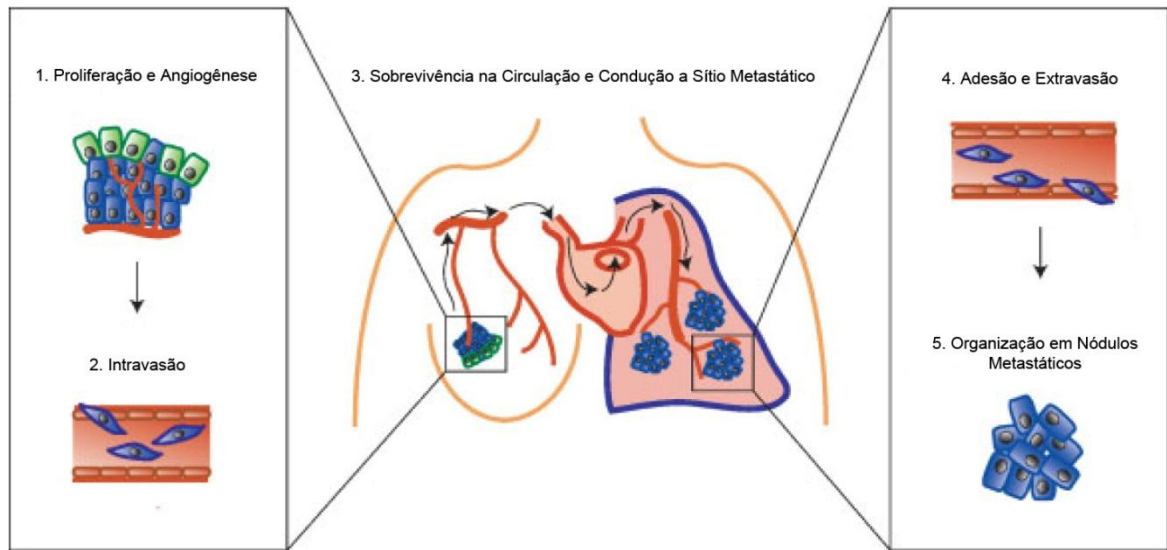


Figura 3 - Progressão metastática do câncer de mama. A progressão envolve uma sequência de passos desde o sítio primário de carcinoma epitelial invasivo até o estabelecimento de nódulos metastáticos em sítios secundários. (1) Proliferação descontrolada de células cancerosas e aporte de nutrientes via angiogênese. (2) Angiogênese também providencia uma rota para o sistema circulatório, resultando na mobilidade células cancerosas pelo corpo. (3) Após invasão intravascular, as células errantes precisam sobreviver na circulação e se conduzir ao sítio metastático. (4) Ao atingir o sítio metastático, as células aderem às células endoteliais e promovem sua passagem através da membrana basal extravasando para a matriz. (5) Invasão do tecido secundário é seguida de reorganização das células cancerosas em novos nódulos tumorigênicos. Extraído de Tse e Kalluri 2007(33).

Um aspecto intrigante do processo de metástase se refere ao fato de que as células neoplásicas apresentam sítios preferenciais de colonização. Em 1889 Stephen Paget postulou uma teoria denominada "*seed and soil hypothesis*" - hipótese do solo e semente. Após observação *post-mortem* de 735 mulheres com carcinoma mamário, ele constatou que a distribuição dos novos sítios metastáticos do tumor em determinados órgãos, não eram aleatórios. Assim, sugeriu que algumas células tumorais ("sementes") cresciam preferencialmente em microambientes de órgãos selecionados ("solo") e que as metástases eram resultantes, apenas quando a semente era implantada num solo apropriado (37). Tal hipótese não foi universalmente aceita e sim contestada por outros, que argumentavam que a anatomia da drenagem vascular e linfática é que determina o padrão de metástase tumoral, onde as células errantes sofrem paradas inespecíficas e colonizam o lugar de parada. Atualmente, o consenso é que, nem a teoria "semente e solo", nem a hipótese mecânico-anatômica precisam ser exclusivas e que o mecanismo de disseminação depende do tumor primário em investigação (38).

O carcinoma mamário é um dos tipos mais frequentes a desenvolver metástase óssea, com uma incidência de aproximadamente 65-75% (39). Supõe-se que características únicas do órgão a ser invadido (como o osso por exemplo), fornecem um tipo de sinalização bioquímica (citocinas, fatores de crescimento) e física (pH ácido, alta concentração de cálcio extracelular) que direciona as células tumorais para o sítio em questão, produzindo um microambiente vantajoso para o crescimento da célula tumoral (33,38,40).

Dentro do contexto de progressão tumoral, os miRNAs têm surgido como importantes reguladores da expressão gênica e assim estariam associados ao estabelecimento e progressão de várias doenças incluindo a tumorigênese (41).

Sendo assim, a ciência genômica encontrou uma oportunidade ímpar de reavaliar o conceito de angiogênese e metástase tumoral, quando passou a considerar como modelo de avaliação desses processos, o estudo da regulação da expressão gênica pelo controle pós-transcricional exercido pelos miRNAs.

1.3 Regulação pós-transcricional exercida pelos microRNAs

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.

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 (42). Os miRNAs tornaram-se muito importantes no entendimento molecular do câncer humano há poucos anos (43). MicroRNAs 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 proteica pelo pareamento com seu RNAm alvo levando a inibição da tradução ou degradação do RNAm alvo (43).

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 a inibição da tradução ou a degradação do RNAm (44). 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 (43) (**Figura 4**).

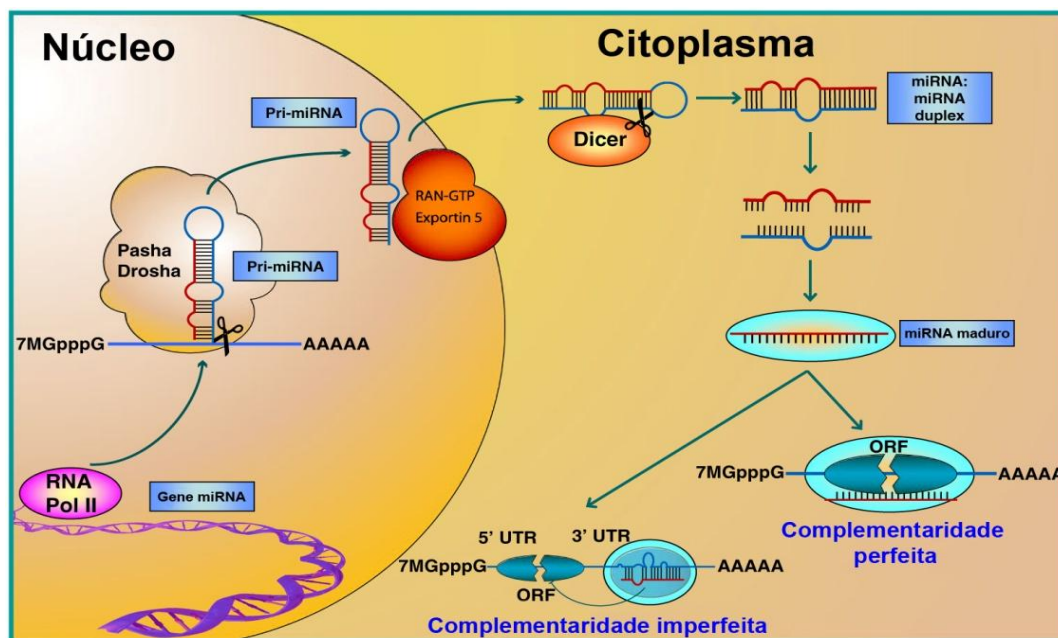


Figura 4 - Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs. Adaptado de Kutanzi *et al.*, 2011 (45).

No entanto, trabalhos recentes apontam um outro mecanismo de regulação menos comum exercido pelos miRNAs, através da região 5'UTR. A maquinaria de tradução é rigidamente controlada em células de mamíferos, em parte também pelo controle da tradução de proteínas ribossômicas cuja tradução destas e de outras proteínas envolvidas na síntese proteica é regulada via 5'UTR (46). Curiosamente, este tipo de regulação pode promover a elevação da tradução ao invés da repressão, como demonstrado com o miR-10a e as proteínas ribossômicas por Orom *et al.*, 2008 (46). Outras evidências apontam o miR-122 associado a região 5'UTR do RNA genômico do vírus da hepatite C, ou o miR-373 se associando a regiões promotoras e elevando os níveis de E-caderina por exemplo (47).

O fato dos miRNAs serem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, faz com que um único miRNA possa regular muitos RNAm alvos, além de cooperarem no controle de um único RNAm (44). As ferramentas atuais e de bioinformática utilizadas para estudo dos miRNAs ainda sofrem atualizações e melhoramentos constantes, dado ao fato de que novas funções moleculares e mecanismos de ação continuam surgindo destas pequenas moléculas (48).

Embora estejamos no início do entendimento da biologia dos miRNAs e seu modo de ação, o crescente número de estudos vem revelando a importância desses 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 (49).

Diante deste panorama o processo de metástase tumoral encaixa-se perfeitamente como modelo de estudo para a identificação de miRNAs que possam estar relacionados tanto com a angiogênese/linfangiogênese quanto com a invasão e metástase tumoral.

Isto porque embora a função dos miRNAs como oncogenes ou como supressores tumorais já tenha sido bem caracterizada, os mecanismos de mediação da metástase exercido pelos miRNAs foram abordados apenas recentemente (50).

1.4 MicroRNAs como biomarcadores de metástase no câncer de mama

Um crescente número de estudos demonstram que os miRNAs desempenham importante papel no início, progressão, invasão e metástase tumoral entre os diferentes tipos de cânceres (42,51).

O envolvimento dos miRNAs no processo de metástase tumoral está sob intensa investigação nos últimos anos. Este processo foi inicialmente descoberto por Ma e colaboradores (50) que encontraram o miR-10b como iniciador de invasão e metástase no câncer de mama. Pouco tempo depois Tavazzoie *et al* 2008 (52) revelaram que miR-335 suprime a metástase e migração por ter como alvo o fator de transcrição SOX4 e tenascin C, componentes da matriz extracelular. Ao mesmo tempo, relatou-se que miR-373 e miR-520c estimulam a célula tumoral a migração e invasão e propuseram que a supressão de CD44 (que codifica um receptor de superfície para o ácido hialurônico e parece ser um candidato a marcador para detecção precoce do câncer) parece ser um mecanismo subjacente (53).

Em conjunto, estes estudos revelaram um marco no balanço entre RNAs não codificadores como estimuladores e inibidores de metástase, de tal forma que, a identificação de diversos alvos poderia potencialmente representar uma ligação molecular entre o descontrole na expressão de determinado miRNA e um comportamento específico de determinado tumor.

Estas são descobertas importantes não só porque abrem um novo campo de investigação, mas também, porque os autores dissecaram finamente as vias moleculares que estão envolvidas no processo de metástase do tumor mamário.

A superexpressão de miR-10b promove invasão e metástase. Sendo assim, o próximo passo foi comprometer-se com a difícil tarefa de dissecar o caminho molecular que liga miR-10b ao processo metastático (50). Esses autores descobriram que o gene Twist, um fator de transcrição promotor de metástase, poderia induzir a expressão de miR-10b e que miR-10b é um elemento essencial no programa de indução de metástase induzido por Twist. Além disso, demonstraram que HOXD10, um fator de transcrição homeobox que promove ou mantém um fenótipo diferenciado em células epiteliais, é alvo de miR-10b e que HOXD10 é realmente pouco expresso em tumores metastáticos. Finalmente, os autores mostraram que RhoC, uma proteína envolvida na metástase, que é reprimida por HOXD10, torna-se fortemente expressa em resposta à expressão de miR-10b.

O trabalho de Huang e colaboradores (54) revelou que miR-373 e miR-520 também são miRNAs promotores de metástases. Anteriormente, o miR-373 foi associado ao câncer testicular, mas não à metástase. A 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*. Além disso, a superexpressão de miR-373 e miR-520 resultou no aparecimento de nódulos metastáticos nas células MCF-7, que estavam ausentes nas células controles. Elucidando as vias moleculares envolvidas neste processo de metástase, os autores descobriram que as sequências denominadas “*seeds*” de miR-373 e miR-520 eram similares, sugerindo que eles poderiam regular um conjunto comum de genes alvos. Entre nove genes potencialmente alvos, o CD44 foi encontrado como sendo um alvo potencial de ambos miR-373 e miR-520.

Com o intuito de se verificar a importância desses resultados em carcinomas primários de mama, foram avaliadas, amostras de mama normal em relação a amostras tumorais. Observou-se que miR-373 estava superexpresso no tumor, em especial em tumores com metástase linfonodal. Além disso, uma correlação inversa com a expressão de CD44 foi identificada (53). Estes achados reforçam a importância dos estudos realizados em linhagens celulares de câncer de mama.

Vale ressaltar que estudos recentes estabeleceram uma ligação entre hipóxia (uma característica fundamental do microambiente tumoral) e um grupo de miRNAs, em parte explicada pela direta ativação transcricional do FIH-1 por miRNAs específicos. Perfis de

expressão baseados em resultados de *microarrays* mostraram que miR-23, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, miR-107, miR-181, miR-210, e miR-213, são induzidos em resposta a baixa tensão de oxigênio (55). Outros estudos, tentam relacionar a expressão de determinados miRNAs com o diagnóstico e prognóstico de pacientes. Para isso, os miRNAs são isolados de fontes diferentes (soro ou tecido) e diferentes estágios da patologia e depois correlacionados com os dados clínicos, como no trabalho de Zhu *et al* 2011 (56), que comparando diferentes estádios clínicos, tecidos adjacentes, pacientes e controle saudáveis, apontaram o miR-96, miR-182 e miR-183 como potenciais biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de câncer de pulmão. Ainda neste contexto de progressão da doença, Valastyan 2012 (57) ressalta que há muito a se entender e explorar neste campo de pesquisa, mas destaca o potencial destas pequenas moléculas, e aponta uma série de microRNAs descritos como cruciais na evolução de cada uma das diferentes fases do processo de metástase do câncer de mama.

A capacidade do perfil de expressão de miRNAs de classificar tumores mamários, de acordo com variáveis clínico-patológicas usadas na rotina para prever a progressão da doença, destaca o potencial das assinaturas de miRNAs como novos indicadores prognósticos que podem contribuir para melhorar a seleção de pacientes para determinada terapia. A expressão de miRNAs baseada em *clustering* de tumores de mama de acordo com suas distintas subclasses moleculares (58) poderia caracterizar ainda melhor a base molecular intrínseca a esses subtipos, talvez definir mais precisamente subgrupos de câncer de mama, e fornecer oportunidades para a identificação de novos alvos que podem ser explorados para terapia-alvo (59).

O interesse por estas moléculas promissoras e sua possível aplicação clínica é crescente na literatura, uma vez que a medicina atual e a genômica estão cada vez mais entrelaçadas, surgem novas possibilidades de descoberta de biomarcadores eficientes e melhora significativa da estratificação de quais pacientes poderiam se beneficiar de um tratamento mais agressivo, ou quais teriam maior risco de ter recidiva metastática, ou ainda quais poderiam se beneficiar de novas drogas ainda em desenvolvimento cuja base de atuação se dá pelos mecanismos dos miRNAs (60).

Diante do exposto, este trabalho buscou evidenciar a modulação transcricional de microRNAs em amostras de pacientes com carcinoma mamário em diferentes estádios clínicos, que apresentaram ou não recorrência metastática ao longo do tempo. Para isto,

utilizamos a tecnologia de *microarrays* e ferramentas de bioinformática, o que nos permitiu identificar assinaturas de expressão diferencial de miRNAs característicos de cada estadiamento clínico associados à metástase. Nosso objetivo foi melhor elucidar o processo de progressão do câncer de mama e os mecanismos moleculares que governam este processo.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2. JUSTIFICATIVA

Os tumores de mama apresentam padrões de expressão gênica alterada. Evidências indicam que os microRNAs (miRNAs) regulam a expressão de diferentes genes (regulação pós-transcricional) associados com invasão, migração e metástase tumoral. No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que evidenciam o papel dos miRNAs como potenciais biomarcadores de metástase tumoral cujos padrões de expressão estão associados a um pior prognóstico.

Hipótese

Considerando que miRNAs podem atuar tanto como supressores quanto promotores de metástases, dependendo de seus RNAm alvos, nossa **hipótese** é que existem determinados microRNAs que apresentam padrões de expressão alterados em tumores de mama potencialmente metastáticos.

Tais microRNAs estariam associados ao processo de metástase e uma vez identificados, poderiam servir como biomarcadores auxiliando na identificação de tumores potencialmente metastáticos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral deste projeto é avaliar o perfil de expressão de miRNAs durante o processo de invasão e metástase tumoral em pacientes com carcinoma mamário invasor.

Objetivos específicos:

1. Avaliar e comparar o perfil de expressão diferencial de miRNAs em tumores de pacientes com carcinoma mamário invasor, utilizando a tecnologia de *microarrays*.
2. Confirmação dos miRNAs apontados como biomarcadores de metástase nos tumores de pacientes com carcinoma mamário invasor, utilizando a tecnologia de qRT-PCR,
3. Analisar os dados clínico-patológicos em conjunto com os achados moleculares a fim de identificar miRNAs candidatos a marcadores de metástase tumoral e durante a progressão tumoral, em pacientes com câncer de mama.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional de coorte retrospectivo.

4.1.1 Aspecto Ético

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII, SP, Brasil (CEP) e encontra-se aprovado (processo: 362/2010). O estudo foi realizado a partir de casos selecionados obtidos do arquivo de anatomia patológica do Departamento de Patologia e no Banco de Tumores do Hospital de Câncer de Barretos, não envolvendo experimentação ou entrevista com as pacientes.

Os pesquisadores garantem sigilo de todas as pacientes, não divulgando publicamente o nome ou qualquer outra informação que possa identificar as mulheres envolvidas neste estudo.

4.1.2 Critérios de Inclusão

- Carcinoma mamário nas formas ductal e lobular
- Estádio clínico I, II e III
- Ausência de tratamento prévio
- Tratamento no Hospital de Câncer de Barretos

4.1.3 Critérios de Exclusão

- Seguimento inadequado, ou óbito precoce por outra patologia
- Presença de outro sítio tumoral primário
- Ausência de material parafinado suficiente para análise
- Ausência de boa qualidade do RNA após extração

4.1.4 Casuística e organização dos grupos de pacientes

A casuística global corresponde a uma coorte retrospectiva de 956 mulheres portadoras de câncer de mama, não submetidas a tratamento prévio, atendidas no período de 1998 a 2001 no Departamento de Mastologia do Hospital de Câncer de Barretos. Desta população foram excluídas pacientes nos estádios clínicos (EC) 0 e IV, sendo as pacientes avaliadas a

partir de um banco de dados com informações relativas ao tratamento, recorrência e óbito destas pacientes. Neste período o seguimento mediano foi de 86.5 meses (variação de 1 a 141 meses), com taxas de perda de seguimento de 3,7%. Ao final do período, 32.7% tiveram óbito por neoplasia, 6.4% tiveram óbito por outra causa, 8.8% encontram-se vivas com neoplasia e 51% encontram-se vivas sem evidência de neoplasia. Das 832 pacientes com estágio 0 a III, a taxa de recorrência foi de 31.6%. A taxa de recorrência encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Recorrência/ Metástase em função do estágio clínico ao início do tratamento. Hospital de Câncer de Barretos. Período de 1998 a 2001.

EC-TNM	Recorrência/ Metástase		Total
	Ausente	Presente	
I	102 (87.2%)	15 (12.8%)	117
Ila	183 (80.6%)	44 (19.4%)	227
Ilb	81 (64.8%)	44 (35.2%)	125
IIla	50 (56.8%)	38 (43.2%)	88
IIlb	51 (63.0%)	30 (37.0%)	81
IIlc	52 (36.1%)	92 (63.9%)	144
Total	569 (68.4%)	263 (31.6%)	832

As pacientes foram selecionadas em função do desfecho conhecido, isto é, pacientes com metástase a distância, que foram comparadas com pacientes que não desenvolveram metástase à distância no mesmo estadiamento clínico. Foram inicialmente previstas 30 pacientes em cada subgrupo de estadiamento, sendo estas selecionadas a partir do banco de dados e pareadas frente ao estágio TNM, subclassificadas pelo EC global, EC-T e EC-N, separando-se em dois grupos, isto é, pacientes com recorrência metastática e sem recorrência metastática. Os casos foram selecionados de forma sequencial em função do registro hospitalar utilizando o TNM, sétima edição (61). Na ausência de correspondente com metástase avaliava-se o caso com o estadiamento que apresenta características mais próximas, sendo a escolha de maneira sequencial do banco de dados.

Posteriormente os prontuários foram avaliados, obtendo-se informações frente ao número do anatomopatológico. Na presença de material tumoral presente sob a forma de

blocos de parafina, a paciente era incluída. Na ausência de material parafinado, a paciente era excluída, sendo avaliado quando possível, um novo caso no banco de dados, escolhido também de maneira sequencial.

Após a coleta do material, realizou-se análise estatística visando avaliar a adequação do pareamento entre os grupos, conforme dados apresentados nas **tabelas 2 e 3** para a amostragem utilizada no rastreamento de microRNAs por *microarrays*. Nas variáveis categóricas utilizou-se o teste do qui-quadrado e o teste de Fisher. Nas variáveis contínuas, devido ao fato da distribuição do grupo não ser normal, utilizou-se o método de Mann-Whitney. Observou-se que a variável de interesse (metástase) se mostrou distribuída de maneira homogênea entre os grupos, frente à variável escolhida para o pareamento (p valor sem significância estatística).

Tabela 2 - Análise da distribuição das variáveis categóricas entre os grupos com presença ou ausência de metástase à distância.

Metástase		Ausente	Presente	Total	p (χ^2)
Variáveis selecionadas no pareamento					
EC-TNM	EC I	9	4	13	0.385
	EC II	13	10	23	
	EC III	13	15	28	
EC-T (TNM)	T1	15	12	27	0.742
	T2	10	8	18	
	T3	6	3	9	
	T4	4	6	10	
EC-N (TNM)	N0	17	8	25	0.378
	N1	9	10	19	
	N2	5	5	10	
	N3	4	6	10	

Tabela 3 - Análise da distribuição das variáveis contínuas entre os grupos com presença ou ausência de metástase à distância.

	Ausente		Presente		p
	Mediana	Max-Min	Mediana	Max-Min	
Tamanho	3.0	1-6.5	2.1	1-8.5	0.442
Idade	56.0	30-95	51.5	29-83	0.217

Foram elegíveis para as análises de expressão global de microRNAs, 09 pacientes no EC I, 13 pacientes no EC II e 13 pacientes no ECIII que não desenvolveram doença metastática e 4 pacientes do EC I, 10 do ECII e 15 do ECIII que desenvolveram metástase a distância, correspondendo a 13 pacientes no Estádio I, 23 pacientes no Estádio II e 28 pacientes no Estádio III. Os microRNAs que se mostraram diferencialmente expressos na etapa inicial de rastreamento tiveram sua expressão diferencial confirmada por PCR em Tempo Real nesta mesma coorte de rastreamento.

4.1.5 Variáveis clínicas e patológicas

As variáveis clínicas, anatomopatológicas, relacionadas ao estadiamento clínico TNM e ao tratamento e seguimento foram obtidas a partir de levantamento de dados de prontuários, por meio de ficha padronizada e encontram-se na forma de banco de dados, no programa *SPSS statistics 19 for Windows*[®]. Neste banco também encontram-se dados relacionados à metástase, seguimento, óbito e sobrevida.

Dos casos avaliados, realizou-se uma revisão histológica procurando mensurar o impacto de variáveis patológicas na metástase, e possível impacto dos microRNA identificados, como fatores prognósticos na análise univariada e multivariada. Em todas as pacientes, além da avaliação do estágio clínico específico (EC-T-TNM e EC-N-TNM), e da histologia (ductal ou lobular), realizou-se nova reação para avaliação da expressão dos receptores de estrogênio, progesterona, Ki-67, p-53. Her2 e citoqueratina 5/6. A **tabela 4** mostra os marcadores que foram utilizados nas reações de imunohistoquímica.

Na análise microscópica das reações de IHQ os cortes foram analisados em microscópio óptico, com varredura das lâminas em aumento de 40X, aplicando-se o método semi-quantitativo. A análise semi-quantitativa foi feita quanto à positividade ou negatividade do marcador. Os RE e RP foram considerados positivos quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais. As citoqueratinas 5/6 foram consideradas positivas quando a marcação citoplasmática (fraca ou forte) foi observada nas células tumorais. O Ki-67 foi considerado em porcentagem de células marcadas. Para a análise estatística, foi considerado um ponto de corte de 14%. Quanto aos marcadores de membrana como HER2 (Herceptest), foram avaliados com um *score* semi-quantitativo e definidos como negativos a marcação de 0 - 1+ (zero a uma cruz), e como positivos, as marcações moderada 2+ (duas cruzes) e marcação intensa 3+ (três cruzes). O HER2 foi

avaliado pela IHQ e os casos foram confirmados com DISH, sendo o kit de sondas para análise do HER2 da Ventana.

Tabela 4 - Relação dos marcadores utilizados na técnica de imunohistoquímica.

Proteína tecidual	Anticorpo primário	Fabricantes	Diluição	Anticorpo Secundário	Tecido controle positivo da reação
Proteína p53	Rabbit monoclonal 318-6-11	Dako	1:1200	Ultraview Universal	Carcinoma de células escamosas
Receptor estrogênio	Rabbit monoclonal clone SP1	Ventana	Pronto pra uso	Ultraview Universal	Mama
Receptor de progesterona	Rabbit monoclonal clone IE2	Ventana	Pronto pra uso	Ultraview Universal	Mama
Ki-67	Mouse monoclonal MIB-5	Dako	1:600	Ultraview Universal	Amígdala
Her2	Rabbit monoclonal 4B5	Ventana	Pronto pra uso	Ultraview Universal	Mama
Citoqueratina 5/6	Mouse monoclonal D5/16B4	Dako	Pronto pra uso	Dako Flex	Próstata

Procurou-se realizar uma classificação do subtipo molecular através da imunohistoquímica (Luminal A ou B; *basal-like* e Her2 superexpresso), utilizando a classificação proposta por Carey (2006) (62) e Cheang *et al* (2009) (8), apresentadas na **tabela 5**. Todo o material foi analisado por uma única patologista, Dra. Ligia Maria Kerr, com larga experiência em patologia mamária.

Tabela 5 - Classificação molecular baseada na expressão de marcadores pela imunohistoquímica.

Subtipo	RE/RP	Her2	Ki67	C5/6
Luminal A	Positivo	Negativo	≤13%	-
Luminal B	Positivo	Negativo	>14%	-
Her2	Positivo	Positivo	-	-
Basal	Negativo	Positivo	-	-
	Negativo	Negativo	-	Positivo

*Adaptada a partir de Carey (2006)(62) e Cheang *et al* (2009) (8).

4.2 Extração e Quantificação de RNA total

4.2.1 Extração de RNA das amostras parafinadas

Logo após a obtenção das peças cirúrgicas, fragmentos tumorais foram coletados e fixados em formaldeído tamponado 10%. Todo material foi previamente avaliado pela patologista responsável e colaboradora neste projeto Dra. Ligia Maria Kerr, que avaliou os cortes histológicos provenientes dos blocos de parafina disponíveis no Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos, corados por Hematoxilina/Eosina. Este procedimento foi utilizado como critério de seleção de blocos com áreas tumorais mais representativas para a extração de RNA, evitando assim a contaminação por excesso de células não tumorais e necrose.

Após a confirmação da área tumoral foram confeccionadas 5 lâminas com 1 corte de 10 μ m cada e a área tumoral foi removida, por meio da raspagem, com agulha BD *Precision Glide* (1,20 x 40mm) e armazenada em microtubo de 1.5mL estéril para extração do RNA. A extração do RNA total foi realizada a partir de 40 μ m (4 lâminas com 10 μ m cada) seguindo o protocolo do kit *Recover All Total Nucleic Acid Isolation (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA)*. Este protocolo é iniciado pela imersão dos cortes em xilol para remoção da parafina, seguida de uma incubação por 3 minutos em termobloco a 50°C, e posterior centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos para formação de *pellet* de células. Na sequência, removeu-se o xilol deixando o *pellet* no fundo do tubo. Realizou-se então, duas lavagens com 1mL de etanol absoluto à temperatura ambiente a fim de remover todo o xilol residual, seguindo de centrifugação a 10.000 rpm, por 2 minutos à temperatura ambiente, deixando-se o *pellet* e removendo o sobrenadante.

O *pellet* de células resultante foi seco em centrífuga a vácuo Savant ISS110 *Speedvac Concentrator (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA)* por 15 minutos na velocidade padrão e temperatura de 45°C. Em seguida, adicionou-se 4 μ L de protease seguido por 100 μ L de tampão de digestão fornecidos pelo kit e as amostras foram então incubadas por 3 horas a 50° C a fim de permitir a completa lise do tecido e liberação do RNA. Realizou-se então uma etapa de inativação da protease por aquecimento a 80° C durante 15 minutos. Decorrido este tempo adicionou-se a cada amostra 275 μ L de álcool absoluto e 120 μ L do reagente *Isolation additive* (fornecido pelo kit) somando um total de 395 μ L por amostra com a finalidade de ajudar na separação dos ácidos nucleicos do resto dos componentes celulares.

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, a saber: inicialmente adicionou-se 700µL 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 500µL 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.

Para eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação realizamos nova centrifugação por 30 segundos a 10.000 x g e à temperatura ambiente. Na sequência, fizemos um tratamento com DNase em que foi preparado um mix contendo: 4µL da enzima DNase, 6µL de 10X DNA buffer e 50µL de água nuclease *free*, todos estes reagentes fornecidos pelo kit. Foram então adicionados a cada amostra, 60µL deste mix no centro da coluna, seguida de incubação por 30 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 700µL da solução *Wash 1* (fornecida pelo kit) 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 500µL da solução *Wash 2* (também fornecida pelo kit).

As amostras foram então novamente submetidas a centrifugação por 30 segundos, a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Com o intuito de eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, realizamos nova centrifugação por 30 segundos a 10.000 x g em temperatura ambiente. O filtro foi então transferido para um novo tubo coletor fornecido pelo kit e 30µL 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 a 13.400 rpm 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.

4.2.2 Avaliação da quantidade e qualidade do RNA

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 40ug 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 *Small Chips* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) (**Figura 5**). Este chip foi escolhido pois permite a quantificação de pequenos RNAs como os microRNAs em amostras obtidas de material parafinado.

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 400µL 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 650µL do RNA Small gel numa coluna com filtro fornecida pelo próprio kit e centrifugou-se por 10.000g, durante 15 minutos em temperatura ambiente, o gel foi aliquoteado em tubos de 0,2mL com 45µL cada e armazenados a -30 ° C até o momento de uso. Em uma alíquota de 45µL em um tubo 0,2µL livre de nuclease, foi adicionado 2µL de RNA 6000 *Small 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 *Small chip* que foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos para leitura de RNAs. Primeiramente adicionou-se 9µL 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, adicionou-se outros 9µL da mistura nos demais pontos indicados com a letra G. Adicionou-se 9µL da *Small RNA conditioning solution* na posição marcada como CS e ainda 1µL de marcador na posição indicada como *ladder* e 5µL de *RNA Small 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 1µL 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 5** mostra o fluxo de trabalho para preparação dos chips e posterior análise da eletroforese microfluidica no *Bioanalyzer*.



Figura 5 – Fluxograma para preparação dos RNA *Small Chip* utilizando o equipamento *Bioanalyzer* 2100 Agilent, para avaliação das amostras de RNA total.

4.3 Oligo *microarrays*

4.3.1 MicroRNAs *microarrays*

Para avaliação do perfil de microRNAs nas amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma mamário foram utilizadas lâminas de *microarrays* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo cada uma quatro regiões com 15.000 oligos (60 mer) representando 723 miRNAs humanos e 76 controles internos preparados pelo processo de SurePrint (sistema de impressão), formato denominado de 8x15k oligo-*arrays* (**figura 6**). 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 microRNA e uma cauda extra), com extrema precisão resultando em alta pureza e alta fidelidade das sondas de microRNAs.

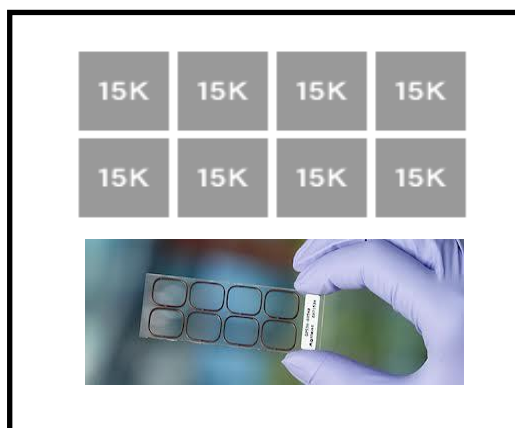


Figura 6 - Agilent *microarrays* no formato 8x15K oligonucleotídeos sintetizada a partir de sequências de microRNAs.

A marcação das amostras foi feita com a utilização do miRNA *Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a partir de 100ng de RNA total. O primeiro passo envolveu a diluição do RNA total para 50ng/ μ L em água livre de nucleases. Posteriormente, adicionou-se 2 μ L (100ng) 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 termobloco por 30 minutos. Em seguida, denaturaram-se as amostras adicionando, em cada uma delas, 2,8 μ L de DMSO 100% em um termobloco, 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: 1 μ L de 10X T4 *RNA Ligase Buffer* (aquecido previamente a 37°C para dissolução do precipitado); 3 μ L de Cyanine3-pCp e 0,5 μ L de T4 *RNA Ligase* (mantida a temperatura ambiente durante o preparo da reação). Após a adição do mix, misturou-se gentilmente, resultando num volume final de 11,3 μ L, 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, 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 resuspensas 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 deve ocorrer 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 surgimento 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*).

4.3.2 - Análise dos dados de *microarrays*

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

Após o escaneamento das lâminas os dados brutos foram quantificados com o auxílio do software *Feature Extraction* versão.11.0 e os arquivos gerados no programa 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* (63). Foi também calculado o valor da mediana de todas as sequências de miRNAs depositadas na lâmina de *microarray*.

- Análise Estatística por Rank Products

Os microRNAs diferencialmente expressos foram identificados pelo teste *Rank Products*, com uso do pacote RankProd em R (64). *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 (65).

Foram considerados como miRNAs diferencialmente expressos em cada estadiamento comparando o perfil de expressão no tumor primário e na metástase de acordo com os parâmetros de *p-value* e *pfp* (porcentagem de falsos positivos), ambos abaixo de 0.05. Dessa forma, foram realizadas análises pareadas entre ECI (sem metástase) e ECIM (com metástase), ECII (sem metástase) e ECIIIM (com metástase) e ECIII (sem metástase) e ECIIIM (com metástase).

4.4. Busca de microRNAs biomarcadores de metástase pelo método da Curva ROC

A fim de selecionarmos quais miRNAs apontados como diferencialmente expressos pelos *microarrays*, seriam bons candidatos a biomarcadores de metástase para os diferentes estadiamentos, utilizamos o método da curva ROC (*receiver operator characteristic curve*). O método da área sob a curva ROC tem sido amplamente utilizado para identificação de biomarcadores (66,67). O princípio é conceitualmente simples, no qual valores de sensibilidade são plotados em relação aos valores de especificidade. A área sob a curva (AUC) fornece um valor entre 0.5-1.0, por isso é também conhecido como estatística-c (68).

Em geral, valores de AUC acima de 0.75 possuem significância clínica (69), sendo que no presente projeto selecionamos microRNAs com AUC acima de 0.8. Foi utilizada a função *glm* (*General Logistic Models*) e o pacote *ROCR* (70).

Os miRNAs de alta sensibilidade e especificidade ($ROC \geq 0,8$) foram agrupados pela distância métrica de Pearson e *Average Linkage* usando o pacote *gplots*.

4.5 Reação de PCR em tempo real para confirmação dos dados de *microarrays*

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi utilizada para a confirmação dos dados de *microarray* para quatro miRNAs, que se apresentaram diferencialmente expressos entre as amostras de paciente com carcinoma de mama metastáticos e não metastáticos nos diferentes estádios clínicos. Para o estadiamento clínico I foram selecionados o miR-21; para o estadiamento II o miRNA miR-183; já para o estadiamento III o miR-140-3p. Selecionamos ainda o miR-494 que se apresentou como diferencialmente expresso em pacientes com tumores metastáticos independente do estadiamento clínico. Para normalização dos dados utilizamos o RNU 48 como miRNA endógeno (cuja expressão se mantém com o mesmo padrão em todas as amostras biológicas) (**tabela 6**).

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 microRNAs 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, 0.15 μ L de dNTP; 1 μ L de enzima *Multiscribe*; 1,5 μ L de *10x RT buffer*; 0,19 μ L de *Rnase inhibitor*; 3 μ L do primer do microRNA de interesse; 4,16 μ L 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 de 5 μ L de *master mix* RT; 2,5 μ L de água *RNAse free*; e 0,5 μ L da sonda do mesmo microRNA 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 8µL do mix em cada poço; e 2µL do cDNA de cada amostra. As reações de qPCR foram realizadas com o auxílio do aparelho 7900 HT *Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems USA)*. A reação tem volume final de 10µL, 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.

Tabela 6 - Sondas utilizadas nas reações de qRT-PCR e suas respectivas sequências.

microRNA	Número de acesso	Sequência
RNU 48	001006	GATGACCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTCGCTGATGCC ATCACCGCAGCGCTCTGACC
hsa-miRNA-183	002269	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
hsa-miRNA-494	002365	UGAAACAUACACGGGAAACCUC
hsa-miRNA-140-3p	002234	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miRNA-21	000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

4.6 Análise dos dados de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

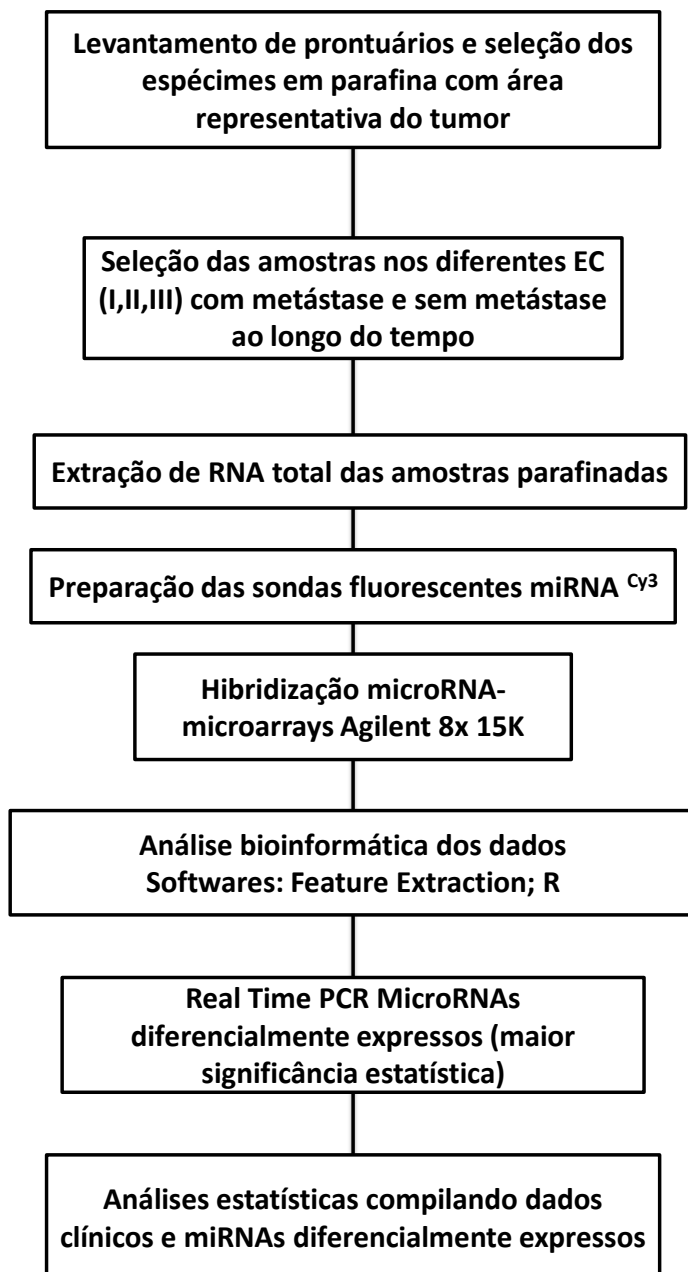
A expressão relativa de cada microRNA foi calculada pela análise comparativa do gene alvo com o do controle interno (RNU 48 *Control miRNA Assay, Applied Biosystems, USA*), utilizando o método comparativo de $\Delta\Delta CT$, usando o programa R para determinação das respectivas quantificações relativas. Como normalizador, utilizamos o valor mínimo de expressão do grupo não metastático em relação ao metastático de cada estadiamento clínico.

A diferença estatística dos miRNAs entre os grupos de pacientes foi calculada usando o teste não paramétrico Mean-Whitney-U-test. Utilizamos como valor de corte o p valor $\leq 0,05$. Em seguida, estes miRNAs foram submetidos a uma análise da curva ROC que estabelece um valor de corte (*threshold*), baseado na expressão diferencial a fim de identificar miRNAs induzidos e reprimidos.

A associação dos padrões de expressão dos miRNAs (induzidos ou reprimidos) com a data de aparecimento da metástase dos pacientes nos diferentes estádios, foram considerados para obtenção da curva de risco relativo, usando o pacote *Survival* do ambiente estatístico-matemático R. Foram utilizados o test-log-rank e a análise multivariada pelo método de Cox. Nesta última, foram avaliadas a influência do T, N, M, histologia (ductal e lobular), assim como os subtipos moleculares. Ambas as análises consideraram $p \leq 0,05$.

DELINEAMENTAL EXPERIMENTAL

5. Delineamento experimental



RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Dados clínicos

Neste trabalho, foram incluídas 64 pacientes portadoras de câncer de mama para rastreamento global de microRNAs, sendo: 35 que não apresentaram metástase à distância ao longo do tempo e 29 que apresentaram recorrência metastática à distância ao longo do tempo. Os grupos foram estratificados de acordo com o estágio clínico em ECI, ECII e ECIII na intenção de encontrar miRNAs comuns ou específicos a cada estágio, que estariam relacionados ao processo de metástase. Observou-se que a variável de interesse (metástase) se mostrou distribuída de maneira homogênea entre os grupos, frente as variáveis escolhidas para o pareamento, com exceção da variável receptor de progesterona ($p=0.018$), como é possível observar na Tabela 7. Ainda nesta tabela, tem-se os dados numéricos da distribuição dos subtipos moleculares, onde os tumores luminais A e B foram agrupados.

Tabela 7 - Análise da distribuição das variáveis categóricas entre os grupos em relação aos subtipos moleculares.

Metástase		Ausente	Presente	Total	$p (x^2)$
Variáveis categóricas observadas após o pareamento					
Histologia	Ductal	30	19	49	0.078
	Lobular	5	10	15	
Receptor Estrogênio	RE +	21	13	34	0.226
	RE -	14	16	30	
Receptor Progesterona	RP +	16	5	21	0.018
	RP -	19	24	43	
Her2	Her2 +	5	8	13	0.158
	Her2 -	30	21	51	
Subtipo Molecular	Luminal	23	13	36	0.265
	Basal like	9	11	20	
	Her2	3	5	8	

6.2 Avaliação da Qualidade e Integridade das Amostras de RNA

Após extração do RNA total das amostras de tumor emblocadas em parafina e fixadas em formalina, realizamos a avaliação das mesmas quanto à contaminação por proteína (razão 260/280) e fenol/reagentes razão (260/230), em que todas as amostras apresentaram razões entre 1,8 e 2,0, indicando desta forma, ausência de contaminação.

Posteriormente as amostras de RNA foram submetidas a análise de integridade por meio de eletroforese microfluidica utilizando o aparelho Agilent 2100 *Bioanalyzer*. A integridade das amostras evidenciando a preservação dos miRNAs pode ser observada pela densitometria, nas quais podemos checar a porcentagem de miRNAs na população de RNA total.

Somente as amostras que apresentaram picos correspondentes a 18-24 nt e que apresentaram concentração de miRNA superior a 40% (**Figura 7**) foram utilizadas pois correspondem população de microRNAs obtida dentro da população do RNA total.

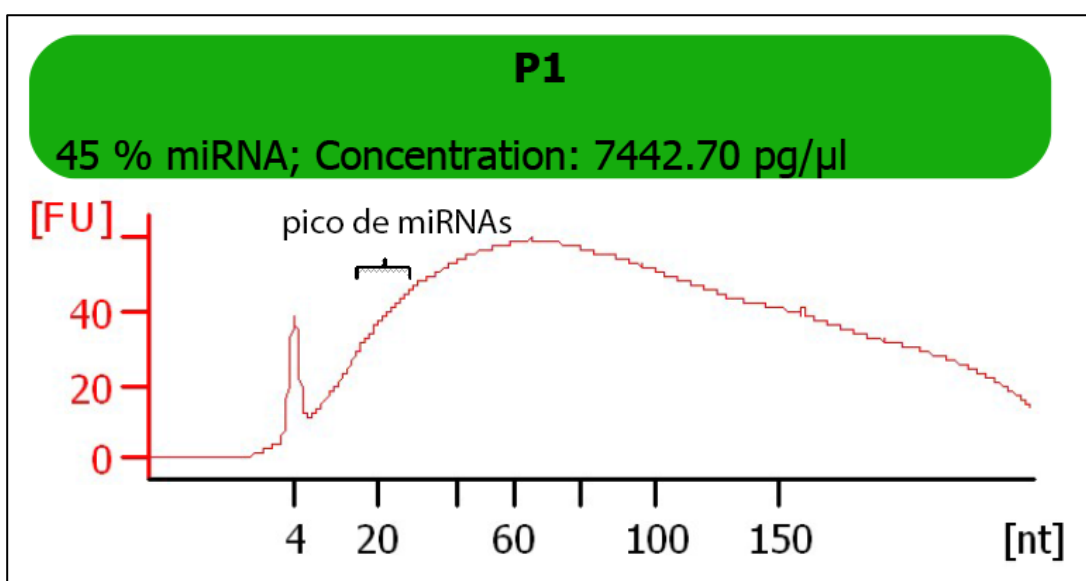


Figura 7 – Imagem típica de um eletroferograma obtido a partir da análise da integridade de uma das amostras de RNA total deste projeto.

6.3 Assinaturas de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos durante a progressão do câncer de mama

A fim de se obter as assinaturas moleculares do miRNAs durante a progressão do câncer de mama, foram realizadas hibridações com *Agilent Human miRNA Microarray* (8X15K - G4471A, Agilent Technologies). Amostras de RNA total (100 ng) foram marcadas utilizando o

Kit miRNA complete labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) segundo as instruções do fabricante.

Os microRNAs foram considerados como diferencialmente expressos em cada estadiamento clínico, comparando o perfil de expressão no tumor primário de pacientes que ao longo do tempo desenvolveram ou não metástase à distância, de acordo com os parâmetros de *p-value* e *pfp* (porcentagem de falsos positivos), ambos abaixo de 0.05. Dessa forma, foram realizadas análises pareadas entre ECI (sem metástase) e ECIM (com metástase), ECII (sem metástase) e ECIIIM (com metástase) e ECIII (sem metástase) e ECIIIM (com metástase). As **figuras 8, 9 e 10** mostram a matriz de expressão com o dendrograma dos microRNAs e das amostras obtidas na comparação entre ECI x ECIM, ECII x ECIIIM e ECIII x ECIIIM, respectivamente .

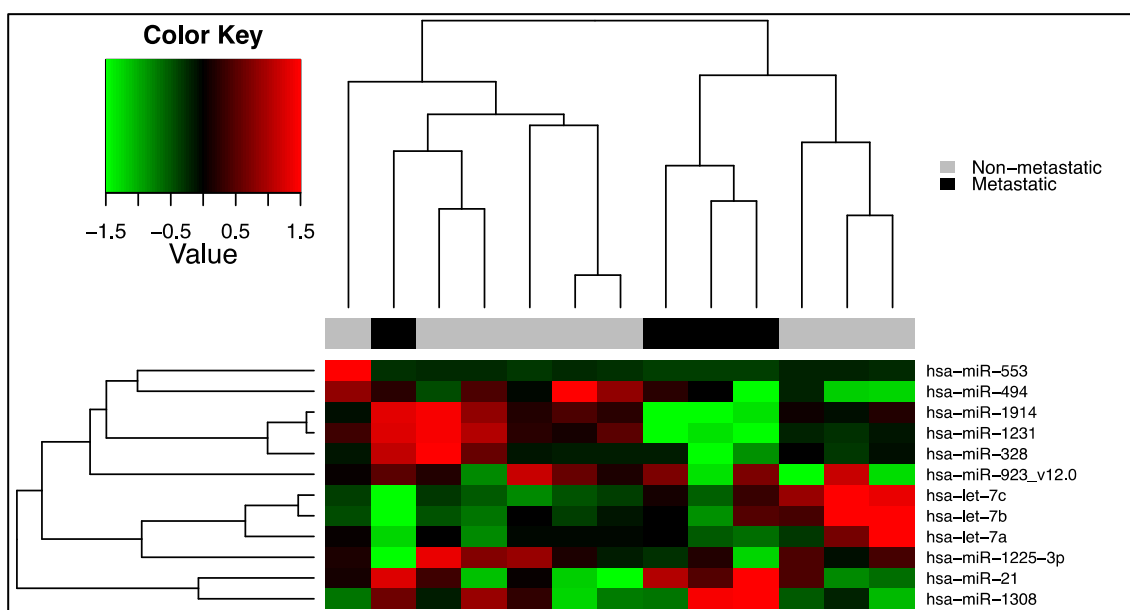


Figura 8 - Matriz de expressão de 12 microRNAs diferencialmente expressos no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama sem metástase e com metástase no ECI. O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, e o preto, sem modulação.

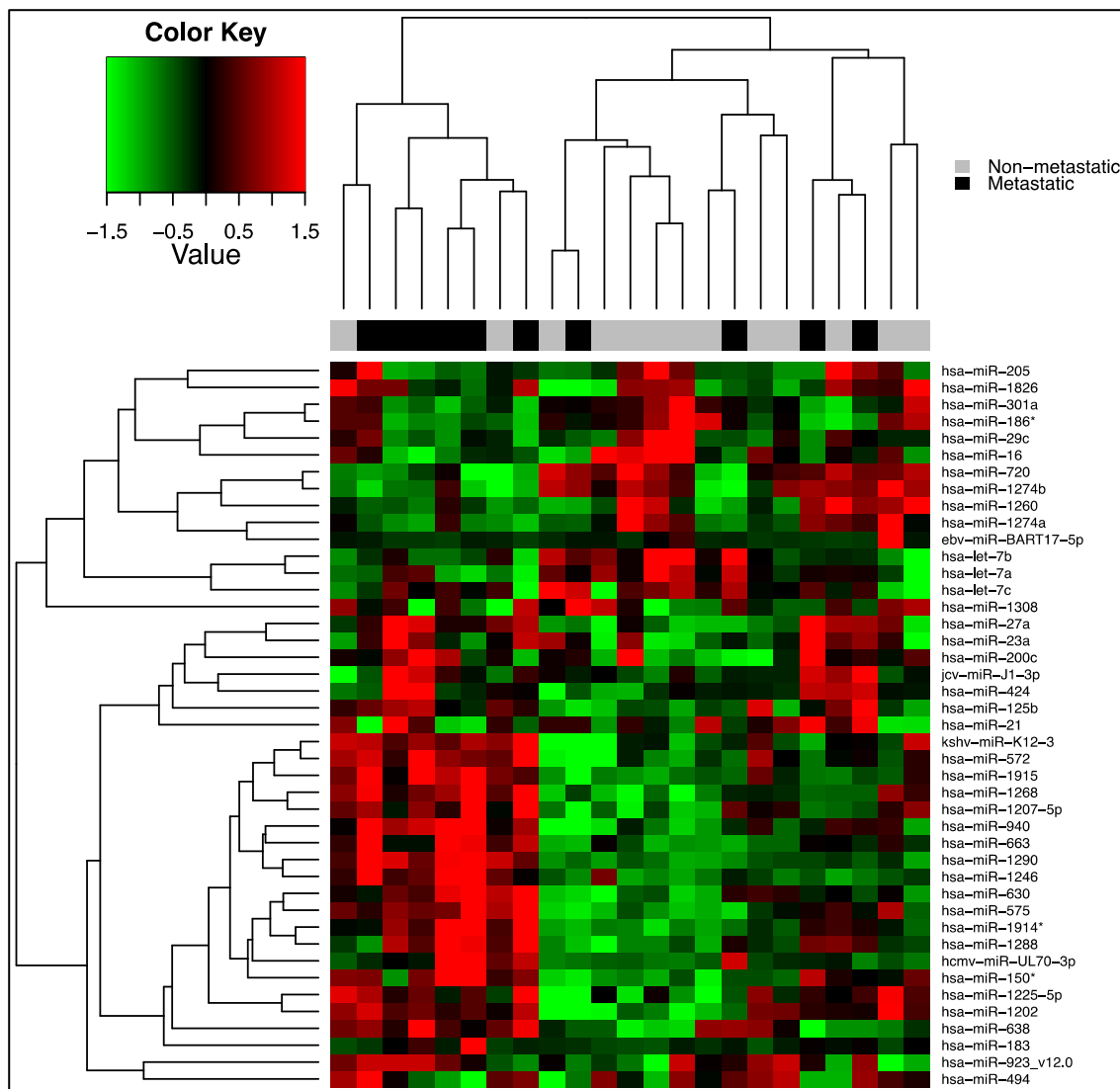


Figura 9 - Matriz de expressão de 43 microRNAs diferencialmente expressos no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama sem metástase e com metástase no ECII. O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, e o preto, sem modulação.

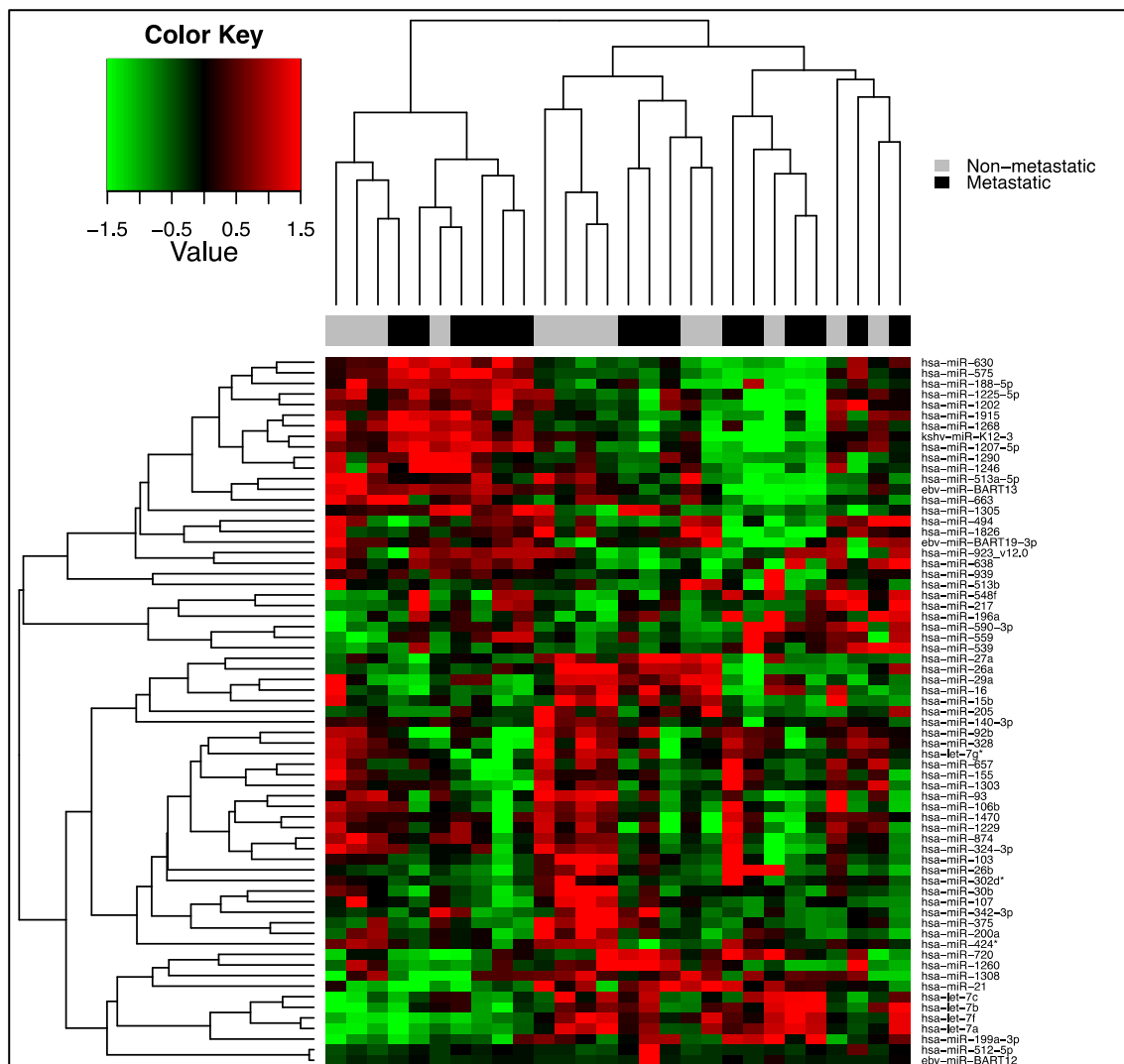


Figura 10 - Matriz de expressão de 67 microRNAs diferencialmente expressos no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama sem metástase e com metástase no ECIII. O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. O vermelho indica indução da expressão, a verde repressão, e o preto, sem modulação.

Podemos observar que no ECI 9 microRNAs se apresentaram induzidos (*up*) e 3 reprimidos (*down*). Já no ECII, 28 miRNAs estavam *up* e 15 miRNAs estavam *down*. Finalmente no ECIII, 20 miRNAs foram observados como *up* e 46 como *down*, sendo que o miR-1236 não mostrou alteração de expressão. A **tabela 8**, apresenta a lista de miRNAs diferencialmente expressos com significância estatística divididos por estágio clínico, juntamente com suas respectivas modulações de expressão.

Tabela 8 - Modulação dos miRNAs diferencialmente expressos em cada estágio clínico.

ECI			
microRNA	P.valor	pfp	modulação
hsa-let-7a	0.00001	0.0045	up
hsa-let-7b	0.00001	0.0011	up
hsa-let-7c	0.00001	0.0212	up
hsa-miR-1225-3p	1.00E-04	0.0496	up
hsa-miR-1231	0.00001	0.005	up
hsa-miR-1308	0.00001	0.0133	down
hsa-miR-1914	0.00001	0.00001	up
hsa-miR-21	0.00001	0.0174	up
hsa-miR-328	0.00001	0.0233	up
hsa-miR-494	5.00E-05	0.0274	up
hsa-miR-553	1.00E-04	0.033	down
hsa-miR-923_v12.0	0.00001	0.008	down
ECII			
ebv-miR-BART17-5p	1.00E-04	0.0212	down
hcmv-miR-UL70-3p	0.00001	0.0024	up
hsa-let-7a	1.00E-04	0.0093	down
hsa-let-7b	5.00E-05	0.0131	down
hsa-let-7c	0.00035	0.03415	up
hsa-miR-1202	4.00E-04	0.03895	up
hsa-miR-1207-5p	0.00001	0.0039	up
hsa-miR-1225-5p	2.00E-04	0.02215	up
hsa-miR-1246	0.00001	0.00001	up
hsa-miR-125b	1.00E-04	0.0122	up
hsa-miR-1260	0.00001	0.00195	down
hsa-miR-1268	0.00001	8.00E-04	up
hsa-miR-1274a	0.00001	0.0059	down
hsa-miR-1274b	0.00001	0.00001	down
hsa-miR-1288	1.00E-04	0.0149	up
hsa-miR-1290	5.00E-05	0.0075	up
hsa-miR-1308	0.00001	0.00695	up
hsa-miR-150*	4.00E-04	0.0358	up
hsa-miR-16	0.00015	0.02465	down
hsa-miR-1826	2.00E-04	0.0305	down
hsa-miR-183	1.00E-04	0.0125	up
hsa-miR-186*	2.00E-04	0.0339	down
hsa-miR-1914*	0.00001	0.0021	up
hsa-miR-1915	0.00001	0.0015	up
hsa-miR-200c	2.00E-04	0.022	up
hsa-miR-205	1.00E-04	0.0243	down
hsa-miR-21	1.00E-04	0.0106	down

(continua na próxima página)

Tabela 8 (continuação) - Modulação dos miRNAs diferencialmente expressos em cada estágio clínico.

ECII			
microRNA	P.valor	pdf	modulação
hsa-miR-23a	0.00001	0.0043	up
hsa-miR-27a	1.00E-04	0.0123	up
hsa-miR-29c	1.00E-04	0.0121	down
hsa-miR-301a	2.00E-04	0.0419	down
hsa-miR-424	1.00E-04	0.0155	up
hsa-miR-494	0.00001	0.0103	down
hsa-miR-572	3.00E-04	0.03065	up
hsa-miR-575	3.00E-04	0.0308	up
hsa-miR-630	5.00E-04	0.0425	up
hsa-miR-638	0.00001	0.0054	up
hsa-miR-663	2.00E-04	0.02005	up
hsa-miR-720	0.00001	0.00001	down
hsa-miR-923_v12.0	0.00001	0.00435	up
hsa-miR-940	0.00001	0.0037	up
jcv-miR-J1-3p	3.00E-04	0.0296	up
kshv-miR-K12-3	2.00E-04	0.0183	up
ECIII			
ebv-miR-BART12	0.00001	0.0058	up
ebv-miR-BART13	2.00E-04	0.02065	down
ebv-miR-BART19-3p	4.00E-04	0.0297	down
hsa-let-7a	0.00001	0.0017	down
hsa-let-7b	0.00001	0.00375	up
hsa-let-7c	0.00015	0.025	up
hsa-let-7f	1.00E-04	0.0148	down
hsa-let-7g*	6.00E-04	0.0438	down
hsa-miR-103	3.00E-04	0.0245	down
hsa-miR-106b	4.00E-04	0.0317	down
hsa-miR-107	3.00E-04	0.0233	down
hsa-miR-1202	2.00E-04	0.0291	up
hsa-miR-1207-5p	0.00001	0.00435	up
hsa-miR-1225-5p	4.00E-04	0.03915	down
hsa-miR-1236	6.00E-04	0.0427	NA
hsa-miR-1246	0.00001	0.00001	down
hsa-miR-1260	0.00035	0.0302	down
hsa-miR-1268	1.00E-04	0.01215	down
hsa-miR-1290	2.00E-04	0.0207	down
hsa-miR-1303	3.00E-04	0.0276	down
hsa-miR-1305	0.00025	0.0305	up
hsa-miR-1308	0.00001	0.00115	down

(continua na próxima página)

Tabela 8 (continuação) - Modulação dos miRNAs diferencialmente expressos em cada estágio clínico.

ECIII			
microRNA	P.valor	pdf	modulação
hsa-miR-140-3p	4.00E-04	0.029	down
hsa-miR-1470	7.00E-04	0.0489	down
hsa-miR-155	7.00E-04	0.0483	down
hsa-miR-15b	1.00E-04	0.0079	down
hsa-miR-16	0.00001	0.00245	down
hsa-miR-1826	0.00001	0.00015	down
hsa-miR-188-5p	0.00045	0.0446	up
hsa-miR-1915	1.00E-04	0.01355	down
hsa-miR-196a	2.00E-04	0.0251	up
hsa-miR-199a-3p	3.00E-04	0.03115	up
hsa-miR-200a	7.00E-04	0.0493	down
hsa-miR-205	0.00001	0.02755	down
hsa-miR-21	0.00001	0.0013	down
hsa-miR-217	4.00E-04	0.0432	up
hsa-miR-26a	1.00E-04	0.0152	down
hsa-miR-26b	3.00E-04	0.0248	down
hsa-miR-27a	8.00E-04	0.0498	down
hsa-miR-29a	2.00E-04	0.016	down
hsa-miR-302d*	5.00E-04	0.0403	down
hsa-miR-30b	0.00025	0.02305	down
hsa-miR-324-3p	6.00E-04	0.0453	down
hsa-miR-328	0.00015	0.0165	down
hsa-miR-342-3p	3.00E-04	0.0272	down
hsa-miR-375	6.00E-04	0.0415	down
hsa-miR-424*	5.00E-04	0.0351	down
hsa-miR-494	0.00001	9.00E-04	down
hsa-miR-512-5p	0.00001	0.0076	up
hsa-miR-513a-5p	1.00E-04	0.0151	down
hsa-miR-513b	3.00E-04	0.0245	down
hsa-miR-539	0.00001	0.0064	up
hsa-miR-548f	5.00E-04	0.0488	up
hsa-miR-559	2.00E-04	0.0265	up
hsa-miR-575	1.00E-04	0.0103	up
hsa-miR-590-3p	4.00E-04	0.0427	up
hsa-miR-630	4.00E-04	0.0449	up
hsa-miR-638	2.00E-04	0.027	up
hsa-miR-657	8.00E-04	0.0499	down
hsa-miR-663	1.00E-04	0.0148	down
hsa-miR-720	0.00001	0.00001	up

(continua na próxima página)

Tabela 8 (continuação) - Modulação dos miRNAs diferencialmente expressos em cada estágio clínico.

ECIII			
microRNA	P.valor	pdf	modulação
hsa-miR-874	8.00E-04	0.0498	down
hsa-miR-923_v12.0	1.00E-04	0.0129	up
hsa-miR-92b	5.00E-04	0.0366	down
hsa-miR-93	2.00E-04	0.0193	down
hsa-miR-939	3.00E-04	0.0279	down
kshv-miR-K12-3	3.00E-04	0.0279	down

6.4 Interpolação dos miRNAs diferencialmente expressos durante a progressão tumoral por meio da construção de um diagrama de Venn

A fim de avaliarmos a existência de relações entre o conjunto de microRNAs diferencialmente expressos em cada comparação (com e sem metástase) e os estadiamentos clínicos (ECI x ECIM; ECII x ECIIIM; ECIII x ECIIIM), fizemos o diagrama de Venn, que compara os microRNAs obtidos em cada estadiamento utilizando o pacote *gplots* em R (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>). A **figura 11** mostra o diagrama de Venn, apontando sete miRNAs que são diferencialmente expressos e comuns ao processo de metástase. São eles: hsa-let7a, hsa-let7b, hsa-let7c, hsa-miR-1308, hsa-miR-21, hsa-miR494, hsa-miR-923 V12.0.

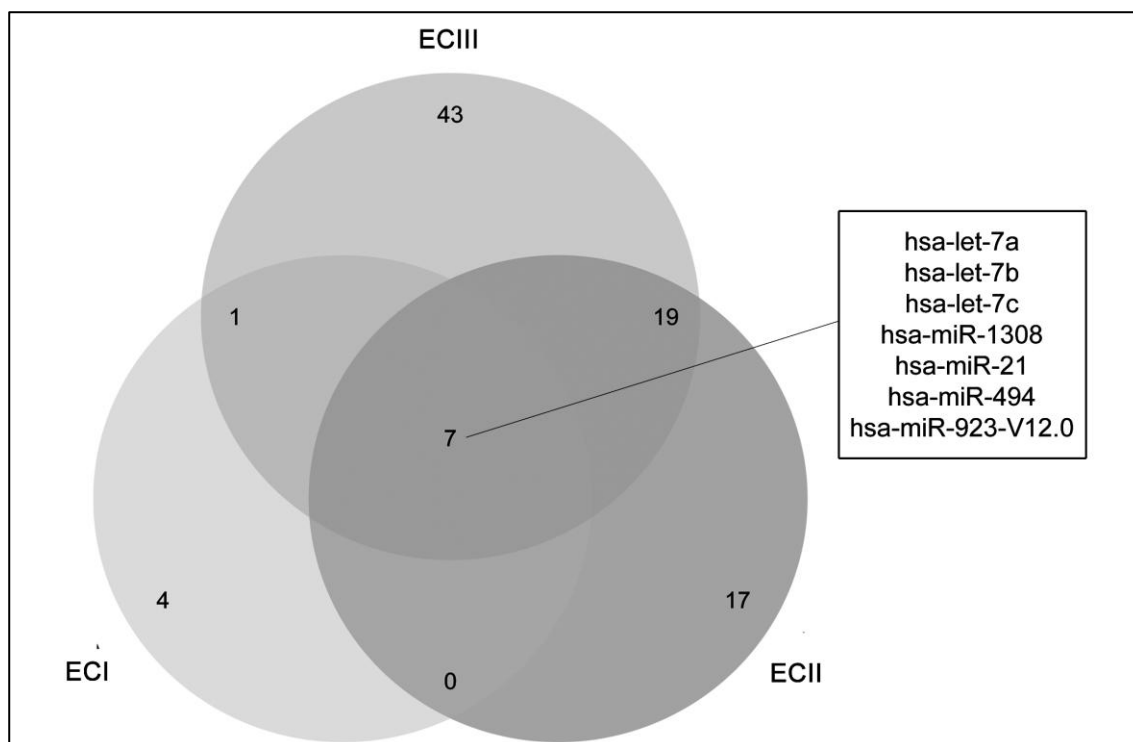


Figura 11 - Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de miRNAs apontados como diferencialmente expressos nas análises de *microarrays*. Podemos identificar os 7 miRNAs comuns aos três estádios e os demais representam os miRNAs específicos de cada estágio e comuns a mais de um estágio ($p \leq 0,05$).

Destes sete miRNAs encontrados como comuns a tumores metastáticos durante a progressão tumoral, destacamos que quatro deles (hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c e miR-21) já estão sabidamente relacionados ao processo de metástase, por terem como alvos alguns supressores tumorais (PTEN) e proto-oncogenes (genes Ras), o que valida nossos resultados com outros estudos previamente analisados.

Dentre estes sete miRNAs selecionamos o miR-21 (já sabidamente envolvido na carcinogênese) e o miR-494 (pois não existem evidências concretas do seu papel no processo de metástase em câncer de mama), para confirmação dos dados por PCR em Tempo Real.

6.5 Busca de microRNAs biomarcadores de metástase na progressão do câncer de mama, pelo método da Curva ROC

A partir dos miRNAs apontados como diferencialmente expressos pelos *microarrays* utilizamos o método da curva ROC a fim de avaliar quais destes miRNAs seriam bons candidatos a biomarcadores de metástase. Utilizamos miRNAs que apresentaram a área sob a curva (AUC) acima de 0.8 como miRNAs com potencial significância clínica para biomarcadores de metástase.

Foram então gerados gráficos de cores ou *heatmaps* dos microRNAs diferencialmente expressos e que também foram também considerados significativos pelo método da área sob a curva ROC. Foi utilizada a distância métrica de Pearson para construção dos agrupamentos. As **figuras 12, 13 e 14** ilustram os perfis de expressão dos microRNAs apontados como candidatos a biomarcadores de metástase identificados nas amostras de pacientes nos estadiamentos clínicos I, II e III que apresentaram metástase (ECIM, ECIIM e ECIIM) em relação aos pacientes que não apresentaram metástase respectivamente (ECI, ECII, ECIII).

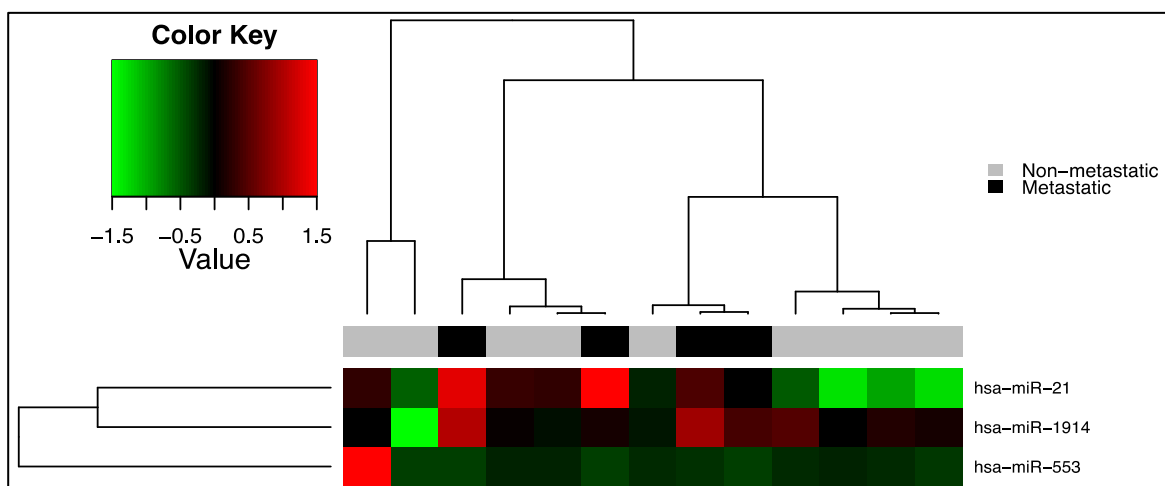


Figura 12 - Comparação dos perfis de expressão de três miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o processo de metástase tumoral em pacientes com câncer de mama estadiamento clínico I ($p \leq 0,05$).

A **figura 12** nos mostra três miRNAs cujos padrões de expressão são mais sensíveis e específicos ao processo de metástase para tumores classificados no estadiamento clínico I. São eles: miR-21, miR1914 e miR-553.

Destes o miR-21 (o primeiro miRNA descrito em mamíferos) já vem sendo amplamente discutido na literatura como um oncomir, pois seus principais alvos já validados são supressores tumorais como PTEN e Bcl2 (entre outros alvos) (71). Alterações na expressão

de miR-21 (superexpressão) vem sendo associada ao desenvolvimento de diversos tipos de tumores humanos dentre eles o câncer de mama (72).

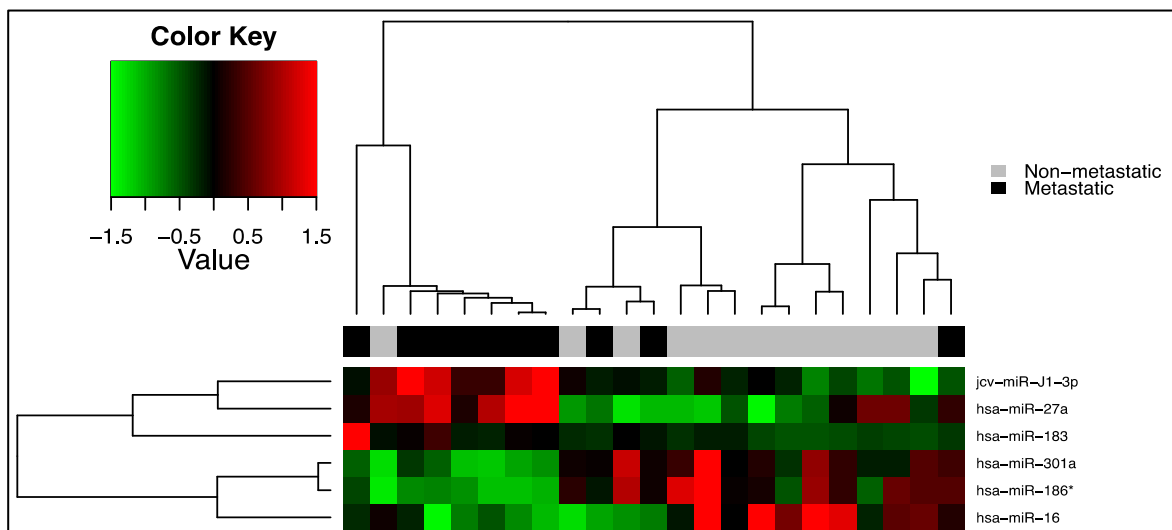


Figura 13 - Comparação dos perfis de expressão de seis miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o processo de metástase tumoral em pacientes com câncer de mama estadiamento clínico II ($p \leq 0,05$).

Para o estadiamento clínico II a **figura 13** evidencia seis miRNAs cujos padrões de expressão são mais sensíveis e específicos ao processo de metástase para tumores de pacientes com câncer de mama neste estágio. São eles: jcv-miR-J1-3p, miR27a, miR183, miR-301a, miR-186 e miR-16.

Destes chamamos atenção para o miR-183, que se mostra superexpresso no tumor da maioria dos pacientes com câncer de mama ECII metastático. Este miRNA apresenta como principais alvos validados metaloproteinases de matriz e desempenha importante papel na regulação de supressores tumorais como EGR1 e PTEN. Além disso, a expressão deste miRNA está diretamente relacionada a tumores de mama que expressam o antígeno Her2/neu (73).

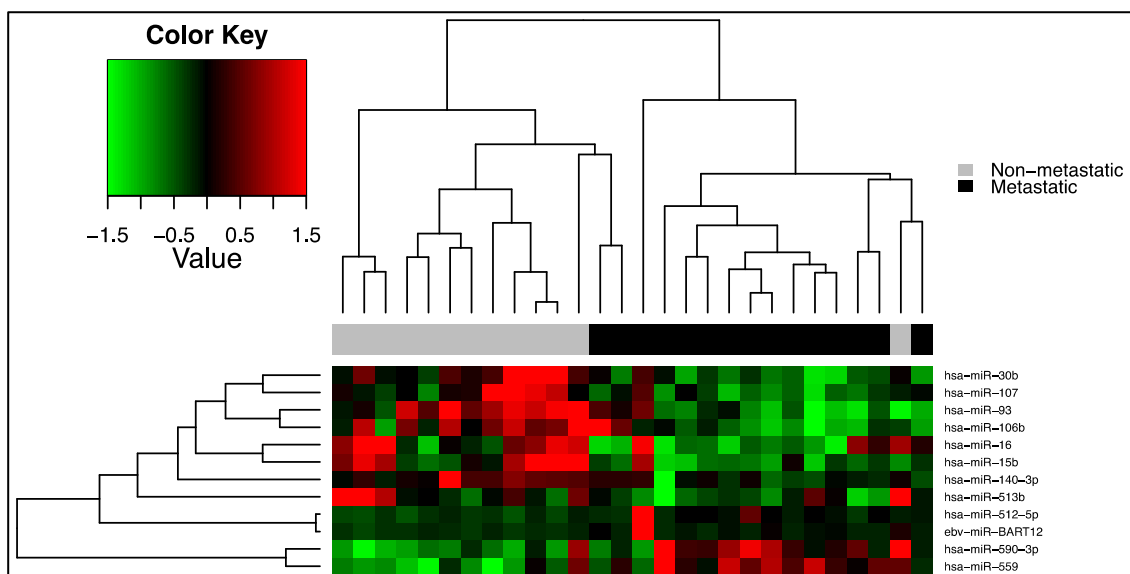


Figura 14 - Comparação dos perfis de expressão de doze miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o processo de metástase tumoral em pacientes com câncer de mama estadiamento clínico III ($p \leq 0,05$).

Finalmente, a **figura 14** nos mostra doze miRNAs, cujos padrões de expressão são mais sensíveis e específicos ao processo de metástase para tumores classificados no estadiamento clínico III. São eles: miR-30b, miR-107, miR-93, miR-106b, miR-16, miR15b, miR-140-3p, miR-513b, miR-512-5p, ebv-miR-BART 12, miR-590-3p e miR-559.

O miR-15b e miR-16 pertencem a um cluster de miRNAs que ao que parece, exercem função de supressor tumoral, regulando negativamente a expressão do fator de transcrição E2F, que é uma molécula chave, tanto na indução da proliferação, quanto da morte celular (74).

6.6 Confirmação dos miRNAs apontados como diferencialmente expressos por qPCR em Tempo Real

Utilizamos o método de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para a confirmação dos dados de *microarray* para cinco microRNAs, que se apresentaram diferencialmente expressos entre as amostras de paciente com carcinoma de mama metastáticos e não metastáticos, nos diferentes estádios clínicos. São eles: miR-21 e miR-494 (diferencialmente expressos nos casos ECI, ECII e ECIII), miR-183 (diferencialmente expresso apenas nos casos ECII) e miR-140-3p (diferencialmente expresso apenas nos casos ECIII).

Antes de realizarmos as reações de PCR em Tempo Real, fez-se necessário uma etapa de padronização das reações e seleção do melhor miRNA endógeno a ser usado como calibrador. Após vários testes para escolha do melhor endógeno selecionamos o RNU48 para normalização dos dados pois apresentava o mesmo padrão de expressão em todas as amostras biológicas analisadas.

Por meio das reação de PCR em Tempo Real conseguimos confirmar a expressão diferencial de dois miRNAs, o miR-183 para as amostras de pacientes do estadiamento clínico II e o miR-494 apenas para as amostras de pacientes do estadiamento I. Estes dois miRNAs se apresentaram superexpressos nas amostras de tecido tumoral metastático, quando comparados às amostras de tecido tumoral não metastático, com significância estatística ($p \leq 0.05$) (**Figura 15**).

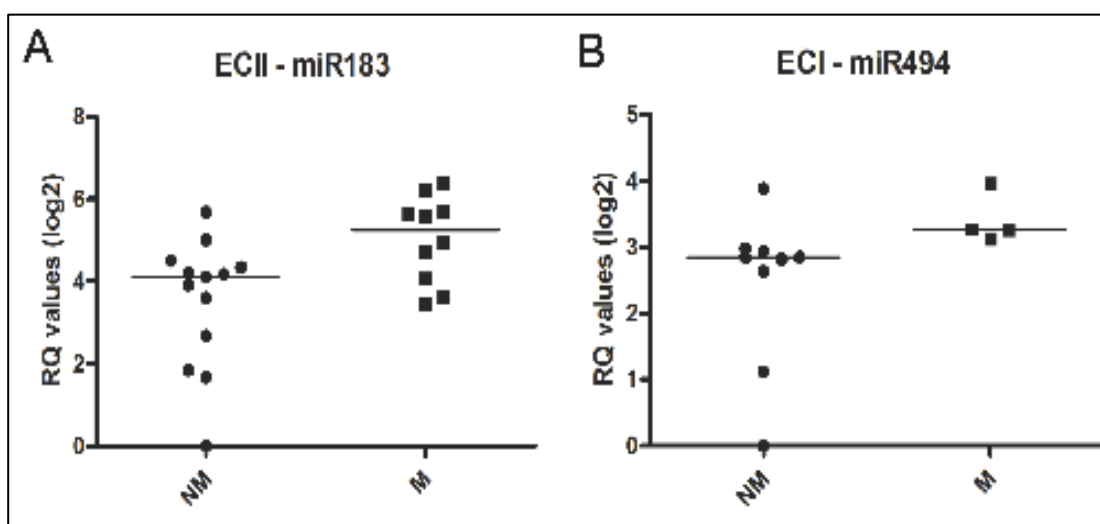


Figura 15 - Confirmação da superexpressão de miR-183 e miR-494 nas amostras de tumores de mama metastáticos (M) em relação aos não metastáticos (NM) nos estadiamentos clínicos II e I, respectivamente (A e B).

Um fato curioso que nossos resultados mostraram é que na análise inicial utilizando a tecnologia dos *microarrays* e também por meio da construção do diagrama de Venn o **miR-494** foi identificado como comumente superexpresso nos tumores metastáticos dos três estadiamentos clínicos. No entanto, quando realizamos o PCR em Tempo Real, foi possível identificar este miRNA com significância estatística alta ($p \leq 0,002$) apenas no estadiamento clínico mais inicial, ou seja, o EC I.

Este é um resultado totalmente original e muito interessante pois sabemos que este miRNA tem como alvos supressores tumorais, especialmente PTEN e que, portanto, a superexpressão de miR-494 pode ser um mecanismo de regulação pós-transcricional associado a eventos de iniciação da carcinogênese. Existem ainda poucos trabalhos na literatura que mostram a associação da expressão deste miRNA com o surgimento e progressão de alguns tipos de tumores. Sendo assim, talvez este miRNA seja um bom candidato a investigações futuras por meio de ensaios funcionais a fim de melhor elucidar o real papel deste miRNA no câncer de mama.

6.7 Associação dos padrões de expressão dos miRNAs com o prognóstico dos pacientes com câncer de mama durante a progressão tumoral

Tendo em vista que a expressão do miR-183 foi confirmada apenas nas amostras do estágio II pelo PCR em Tempo Real, decidimos inicialmente avaliar se havia correlação da expressão deste miRNA com os dados clínicos dos pacientes nestes estadiamento. Nossos resultados mostraram que a superexpressão do miR-183 apresenta uma área sob a curva de 0,769, ou seja, este miRNA parece ser um bom marcador com alta especificidade e sensibilidade para o processo de metástase em pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II (**Figura 16**).

Considerando o potencial deste miRNA como biomarcador para o processo de metástase em tumores de mama de pacientes no estadiamento clínico II, decidimos avaliar se a combinação deste potencial biomarcador com o miR-21 e miR-494, nas amostras de estágio II, apresentava correlação da expressão com os dados clínicos com significância estatística. Fizemos então, uma regressão logística usando o modelo *glm* (*general logistic model*) em ambiente R, a fim de unir a expressão dos três marcadores (miR-183 específico do EC II, miR-21 e miR-494), e as combinações de dois a dois. Os valores resultantes desta regressão logística foram submetidos a análise da curva ROC, para determinação do ponto de corte, que caracteriza o valor predito pela regressão para a superexpressão (*up*) ou diminuição da expressão (*down*) destes miRNAs em cada paciente.

Com este valor de corte, finalmente foi possível fazer a associação do padrão de expressão dos três miRNAs e em combinações de dois a dois, comparados com a data de surgimento da metástase por meio da construção da curva de risco relativo usando o pacote

Survival do ambiente estatístico-matemático R. A probabilidade de recorrência foi avaliada pelo teste log-rank. Ambas as análises consideraram $p \leq 0,05$.

Observamos pelas curvas ROC, que a combinação do miR-183 com o miR-21 e o miR-494 aumenta o valor da área sob a curva, conseqüentemente aumentando o valor preditivo do miR-21 e miR-494 quando vistos separadamente, sugerindo um potencial destas combinações como biomarcadores de metástase para o estadiamento clínico II (**Figura 16**).

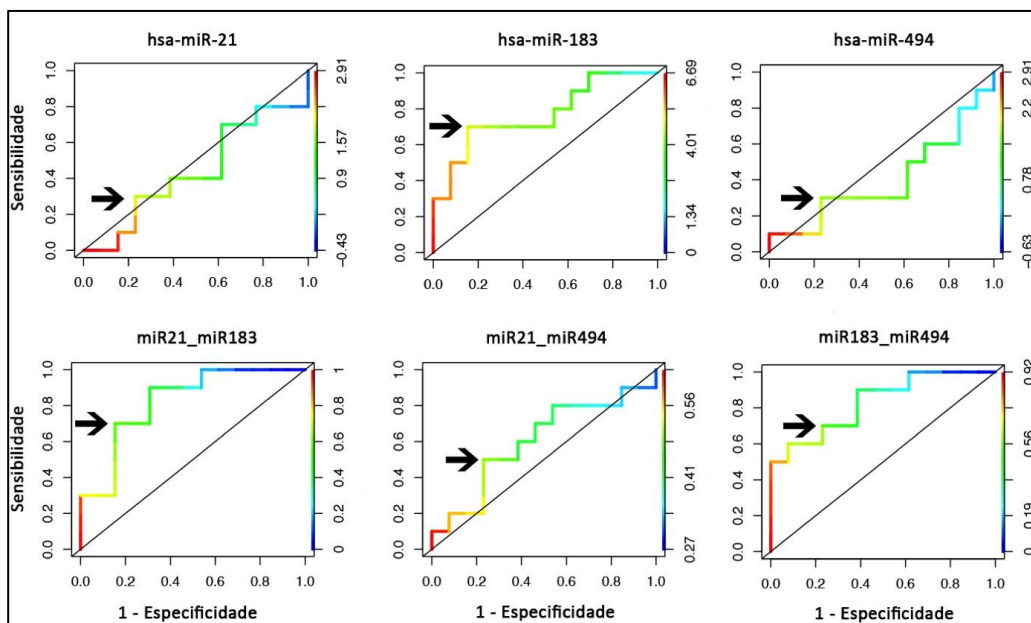


Figura 16 - Curvas ROC obtidas a partir dos dados de expressão dos miRNAs miR-21, miR-183 e miR-494 diferencialmente expressos nas amostras de tumor metastático de pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II.

Realizamos também uma análise da curva ROC, combinando os valores de expressão dos três miRNAs (miR-21, miR-183 e miR-494) a fim de avaliarmos o valor preditivo de metástase nas amostras de tumor de pacientes em estadiamento clínico II (**Figura 17**).

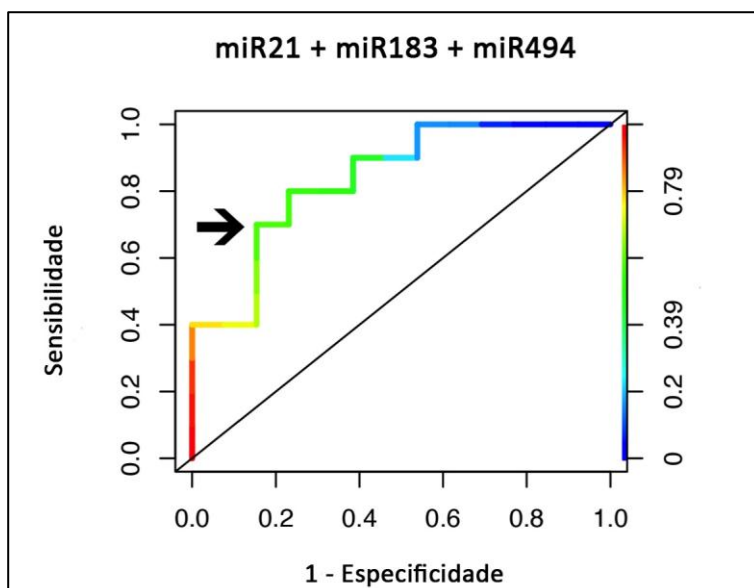


Figura 17 - Curva ROC obtida a partir da combinação dos dados de expressão dos miRNAs miR-21, miR-183 e miR-494 diferencialmente expressos nas amostras de tumor metastático de pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II.

Podemos observar que a combinação destes três potenciais marcadores de metástase apresentou um resultado melhor, no qual houve um significativo aumento da área sob a curva ($AUC=0,838$), evidenciando o potencial destes marcadores para o câncer de mama metastático em estadiamento clínico II. No entanto, a sensibilidade especificidade da combinação não foi superior aos valores do miR-183 analisado separadamente. A **tabela 9** mostra os miRNAs, bem como suas combinações e os valores da área sob a curva; sensibilidade e especificidade, destes potenciais biomarcadores de metástase em amostras do estadiamento clínico II.

Tabela 9 - Tabela dos miRNAs com potencial biomarcador apresentando os valores de corte obtidos por meio das análises de curvas ROC.

microRNAs	Valor de corte	AUC	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
miR21	1,89	0,438	30	75
miR183	4,708	0,769	75	80
miR494	1,688	0,400	30	75
miR21 + miR494	0,497	0,600	50	75
miR21 + miR183	0,431	0,823	90	70
miR183 + miR494	0,354	0,830	70	75
miR183 + miR21 + miR494	0,567	0,838	75	80

Nossos resultados mostraram que não foi possível observar significância estatística entre os grupos de pacientes (metástase versus não metástase) quando associamos os padrões de expressão do miR-21 ($p = 0,88$) e do miR-494 ($p = 0,86$), após o teste estatístico de log Rank neste grupo de pacientes (ECII). Por outro lado, observamos que a superexpressão do miR-183 foi associada a um pior prognóstico, com significância estatística ($p=0,03$), nos pacientes do estadiamento clínico II (**Figura 18**).

Na **figura 18** também podemos observar que a combinação da expressão do miR-21 com miR-494 não foi significativa após o teste de log-rank ($p=0,123$). As outras combinações de marcadores foram significativas: miR-21 com miR-183 ($p=0,004$) e miR-183 com miR-494 ($p=0,001$). Nos casos de estadiamento clínico III não foram encontrados resultados significativos para associação destes marcadores com o prognóstico.

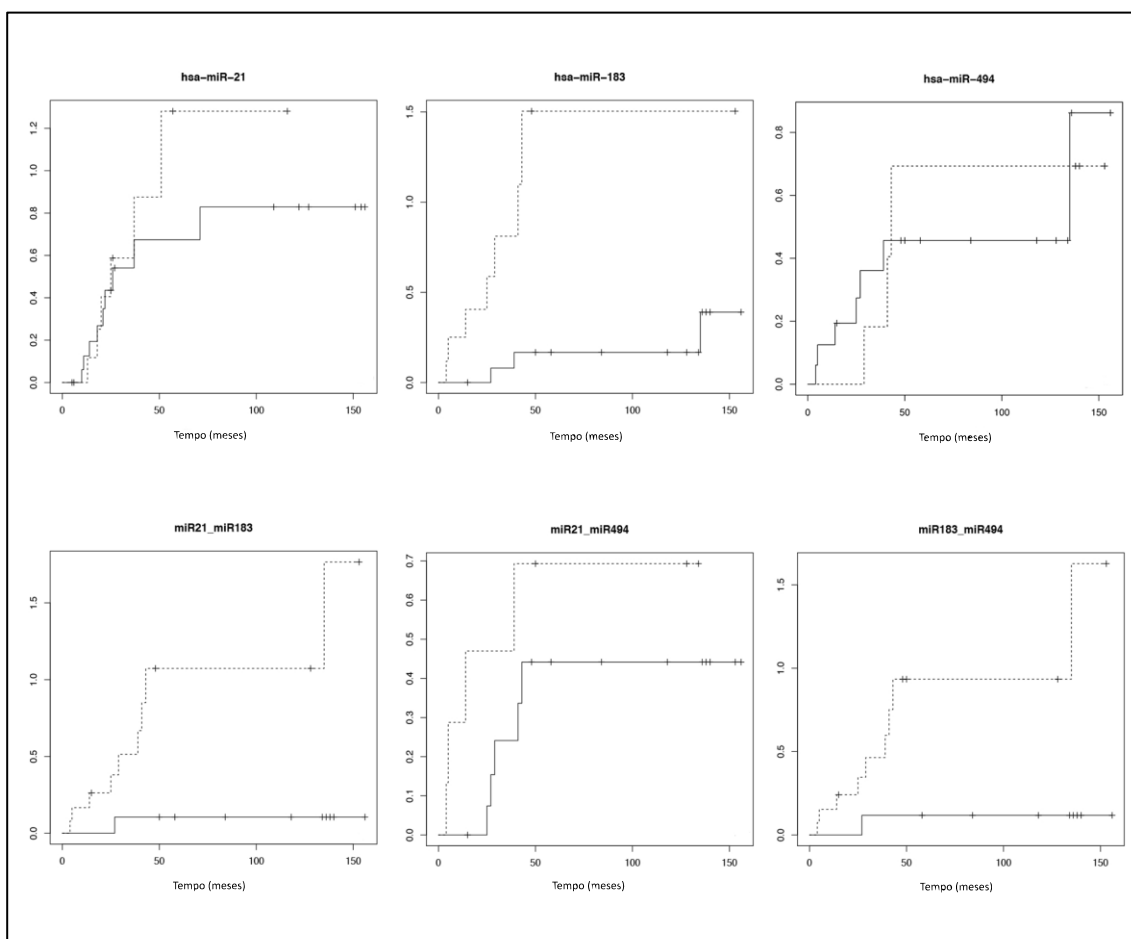


Figura 18 - Curvas de risco relativo associando o padrão de expressão (*up* = linha tracejada/*down* = linha contínua) do miR-21, miR-183 e do miR-494 com a presença de metástase em pacientes com carcinoma mamário invasor estágio II ($p \leq 0,05$).

Considerando que estes três marcadores são potenciais marcadores de risco para o desenvolvimento de metástase nos casos de pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II, avaliamos a combinação da expressão destes três marcadores nos casos deste grupo. Nossos resultados mostraram que a superexpressão destes três miRNAs (miR21 + miR183 + miR494) foi associada a um maior risco relativo de desenvolvimento de metástase nos casos metastáticos do grupo de pacientes em ECII com alta significância estatística ($p=0,002$). O risco relativo para metástase de acordo com o padrão de expressão (*up* ou *down*) dos miRNAs é apresentado na **figura 19**.

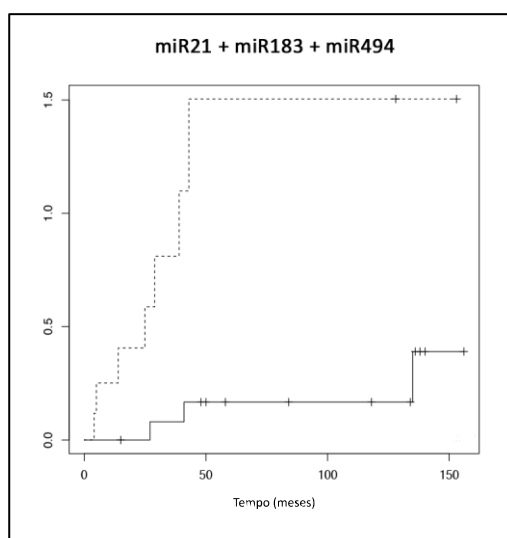


Figura 19 - Curva de risco relativo associando o padrão de expressão (*up* = linha tracejada/*down* = linha contínua) combinado dos três miRNAs (miR-21, miR-183, miR-494) com a presença de metástase em pacientes com carcinoma mamário invasor estágio II ($p \leq 0,05$).

Portanto nossas análises mostraram que quando fazemos a associação da expressão do miR-183 com qualquer um dos miRNAs (miR-21 e miR-494) observamos valores maiores de risco (**Figura 19**). Tal resultado nos mostra que provavelmente, miR-183 seja um potencial biomarcador de risco capaz de discriminar com maior acurácia tumores metastáticos de tumores não metastáticos de carcinoma de mama em estadiamento clínico II.

Considerando o potencial destes miRNAs (miR-183, miR-21 e miR494) como marcadores de risco para desenvolvimento do câncer de mama, realizamos ainda um análise multivariada utilizando a regressão de Cox. Esta análise tem o objetivo de avaliar a capacidade prognóstica em discriminar os pacientes independente das variáveis clínico-patológicas como: histologia; tamanho; envolvimento nodal e subtipo molecular (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Análise multivariada para risco relativo utilizando regressão de Cox para combinar variáveis clínicas com a modulação de três miRNAs de interesse (hsa-miR21, hsa-miR494 e hsa-miR-183).

Covariável		p valor	RR (95% IC)
Histologia	Ductal	0.1105	0.2964 (0.06656-1.32)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.0134	5.8382 (1.44192-23.64)
	Down		1
<hr/>			
Histologia	Lobular	0.1105	3.374 (0.7577-15.02)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.0134	5.8382 (1.44192-23.64)
	Down		1
<hr/>			
T2	T2	0.41401	1.7449 (0.4589-6.635)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.00604	7.584 (1.7856-32.207)
	Down		1
<hr/>			
N0	N0	0.30875	0.4978 (0.130-1.907)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.00733	6.6417 (1.664-26.503)
	Down		1
<hr/>			
N1	N1	0.30875	2.009 (0.5244-7.695)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.00733	6.6417 (1.664-26.503)
	Down		1
<hr/>			
Subtipo Molecular	Luminal	0.99957	0.9996 (0.2747-3.638)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.00921	6.3045 (1.5768-25.208)
	Down		1
<hr/>			
Subtipo Molecular	Basal	0.21919	0.3512 (0.06617-1.864)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.00464	8.3112 (1.91848-36.006)
	Down		1
<hr/>			
Subtipo Molecular	Her2	0.08739	3.766 (0.8233-17.23)
	Outro		1
regulação miRNA	Up	0.00528	8.332 (1.8785-36.95)
	Down		1

Podemos observar pela **tabela 10** que a superexpressão dos miRNAs miR-21, miR-183 e miR-494 foi associada a um pior prognóstico apresentando risco relativo para o desenvolvimento de metástase com significância estatística ($p \leq 0,05$) e intervalo de confiança de 95%, independente das variáveis clínicas e patológicas avaliadas. Estes resultados são bastante promissores considerando que a combinação da superexpressão é bastante nova dentro do contexto de miRNAs como marcadores de risco para o desenvolvimento de metástase no câncer de mama.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Apesar do carcinoma mamário ser amplamente estudado no mundo todo, ainda há muito o que se investigar, mesmo com as diferenças de sobrevida conhecidas entre os subtipos moleculares (3), ao considerar dois pacientes com características clínicas extremamente semelhantes, em questão de classificação TNM e até o mesmo subtipo molecular, não se sabe ao certo o que leva o tumor de um paciente se disseminar para sítios distantes do corpo, anos após o tratamento, enquanto o tumor de outro paciente apresenta ausência de qualquer sinal de retorno da doença.

Nosso estudo procurou contribuir com a expansão do conhecimento em direção a este problema, tendo como objetivo principal a investigação dos miRNAs, que são pequenos RNAs não codificadores com grande potencial para auxiliar na elucidação de mecanismos moleculares associados à carcinogênese, tal como à metástase (57). Deste modo, o presente trabalho se refere a uma análise comparativa da expressão de miRNAs de espécimes tumorais provenientes de pacientes portadores de carcinoma mamário invasivo ductal ou lobular, que ao longo do tempo apresentaram metástase à distância ou não.

Rotineiramente em todo o mundo, o processamento histológico do material cirúrgico faz uso de fixação em formalina para preservação da arquitetura histológica dos tecidos. Assim, as coleções de tecidos fixados em formalina e embebidos parafina, associados com os bancos de dados clínicos dos pacientes, constituem uma fonte de inestimável valor de informação para investigação científica. Ademais, qualquer biomarcador obtido a partir de tecido parafinado mais prontamente pode ser transferido para prática clínica (75), uma vez que muitas vezes este tipo de material é a única fonte disponível.

Com o advento da ciência genômica, técnicas que realizam análises em larga escala, como *microarrays* e PCR em tempo real, são foco de crescente interesse na mineração destas informações clínicas a partir do acesso a acervos de amostras parafinadas como fonte de informação clínico-patológica. Embora o valor de informações obtidas a partir de estudos retrospectivos que utilizam amostras em parafina tenham sido amplamente validados, até pouco tempo atrás, a utilização deste tipo de material para realização de estudos de expressão gênica, não tem sido considerada uma fonte confiável, em virtude da dificuldade em se obter RNA mensageiro intacto a partir destas amostras (76). Isto porque, enquanto a fixação em formalina ajuda a preservar proteínas celulares e conservar a arquitetura do

tecido, este procedimento reduz significativamente a quantidade e principalmente a qualidade do RNA devido a degradação enzimática e química, que ocorre antes e durante o processo de fixação (81, 82). Finalmente, a formalina é responsável por formar ductos mono-metil com as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, em especial a adenina, e esta modificação covalente reduz a eficiência das reações de transcrição reversa utilizadas para avaliação da expressão de transcritos (77).

Devido ao seu pequeno tamanho (19 a 23 nucleotídeos), os miRNAs podem ser menos propensos a degradação, possibilitando seu uso como potenciais biomarcadores para rastreamento do perfil de expressão que caracteriza o status molecular de amostras tumorais embebidas em parafina e fixadas em formalina (FFPE), por meio da tecnologia dos *microarrays* ou qRT-PCR (78).

Neste trabalho foi possível identificar assinaturas de expressão de miRNAs característicos para tumores de pacientes com câncer de mama em diferentes estadiamentos clínicos. Inicialmente as análises dos *microarrays* mostraram 12 miRNAs apontados como diferencialmente expressos no tumores de mama metastáticos no estadiamento clínico I, sendo 9 miRNAs superexpressos e 3 miRNAs reprimidos nos casos metastáticos. Dentre estes, alguns bem descritos como superexpressos na literatura, estavam induzidos, como a família let-7; miR-21; entre outros, que serão discutidos mais adiante.

Para o estágio clínico II, as análises obtidas a partir dos *microarrays* apontaram 43 miRNAs como diferencialmente expressos no tumores de mama metastáticos, sendo 28 miRNAs superexpressos e 15 miRNAs reprimidos nos casos metastáticos. Neste estágio, destacamos a indução do miR-183, um potencial oncomir, que se mostrou muito interessante após as análises de curva ROC, devido ao alto poder de sensibilidade e especificidade na separação dos casos metastáticos dos não metastáticos.

Finalmente, foi possível identificar 67 miRNAs apontados como diferencialmente expressos nos tumores de mama metastáticos em estágio clínico III, sendo que 20 miRNAs estavam superexpressos, 46 miRNAs estavam reprimidos, e um estava sem modulação nos casos metastáticos em relação aos não metastáticos. Novamente, membros da família let-7 se mostraram induzidos, bem como o miR-923, também presente em todos os estágios clínicos. Na sequência discutiremos melhor alguns destes miRNAs.

A partir destes resultados realizamos um diagrama de Venn, a fim de identificarmos se existem miRNAs que são comuns ao processo de metástase, independente do estágio

clínico. Nossas análises mostraram que existem sete miRNAs diferencialmente expressos e comuns ao processo de metástase. São eles: hsa-let7a, hsa-let7b, hsa-let7c, hsa-miR-1308, hsa-miR-21, hsa-miR494, hsa-miR-923 V12.0.

No estudo de Jaiswal *et al* 2012 (79), os autores mostraram que o miR-1308 é transportado por micropartículas (pequenas vesículas com membrana), que são liberadas por células normais e malignas e que este microRNA tem como alvo NKIRAS1, um inibidor de NFκB, que por sua vez é um fator de transcrição com funções importantes de regulação de diferenciação, proliferação, bloqueio de apoptose e resposta imune e tem sido apontado como induzido em carcinoma mamário inflamatório. Em Jones *et al* 2012 (80), o mesmo foi detectado como reprimido no soro de pacientes portadores de mieloma e induzido em controles saudáveis e foi apontado como um potencial biomarcador útil na distinção de pacientes em um estado precursor assintomático e pacientes portadores de mieloma de controles normais. Além disso, a combinação do miR-1308 com o miR-720 permitiu diferenciar o estado assintomático ou presença de mieloma de doenças não relacionadas. Apesar de não encontrados muitos estudos na literatura da função deste miRNA no câncer de mama, estes trabalhos reforçam o grande potencial destas moléculas no uso clínico. Outro candidato apontado no diagrama, o miR-923, no trabalho de Zhou *et al* 2009 (81), em conjunto com outros microRNAs revelou-se como promotor de quimioresistência a Taxol, mostrando-se induzido em linhagens resistentes em comparação com as linhagens parentais sensíveis.

A família Let-7 sabidamente na literatura está relacionada ao processo de colonização metastática, tendo como alvo o gene Ras, c-myc, HMGA2, CCDN1 e outros (82,83), em Kim *et al* 2012 (84), os autores focaram na interação do let-7a e CCR7 no contexto de metástase, mostrando que o miRNA provoca repressão desta quimiocina envolvida em estímulos metastáticos, revelando um potencial para uso terapêutico. Em outro trabalho, de Yun *et al* 2011 (85), os autores apontam o mecanismo de interação pelo qual a proteína supressora de metástase RKIP inibe genes que são alvos da família let-7 (BACH1 e HMGA2), que por sua vez, causam indução de genes promotores de metástase óssea pelo câncer de mama (MMP1, CXCR4). Os autores também ressaltam que a análise de determinados genes e sua sinalização em um determinado contexto, como na metástase, é crítico para o entendimento de seu valor preditivo e potencial terapêutico. Desta maneira, a literatura aqui apresentada condiz com nossas análises de interpolação dos microRNAs

comuns aos pacientes metastáticos, revelando microRNAs envolvidos com resistência a drogas, genes de proliferação, invasão e bloqueio de apoptose.

Quanto ao miR-494, houve uma tendência de superexpressão deste miRNA nos tumores metastáticos em relação aos não metastáticos nos estádios I, II e III. Em Liu *et al* 2012 (86), utilizando diversos modelos animais de tumores estabelecidos (mama, pulmão, linfomas B e T, melanoma e cólon) e linhagens celulares, os autores consistentemente avaliaram a relação do miRNA-494 com o sistema imune e expressão de PTEN. Eles detectaram superexpressão de miRNA-494 em MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells* - células mielóide derivadas supressoras), causada por TDFs (*tumor derived factor* - fatores derivados do tumor) que promovem crescimento e facilitam a metástase do tumor. Através da repressão do supressor tumoral PTEN pelo miRNA-494, há ativação das vias Akt, NFκB e mTOR, induzindo a expressão de metaloproteinases (MMPs) que facilitam a invasão e metástase. Curiosamente, em Haga e Phinney 2012 (87), com ensaios celulares e comparação de biópsias de carcinoma ductal em estágios precoce e mama normal, os autores postularam que o miR-494 está localizado em uma região do genoma denominada DLK1-DIO3, que contém um conjunto de miRNAs supressores tumorais, e embora todos os mecanismos de ação não estejam bem elucidados, sugeriram que este grupo de miRNAs atue cooperativamente na repressão dos processos EMT e proliferação, que acabam por levar á metástase.

Em relação ao miR-21, nossos resultados mostraram que este miRNA apresenta expressão diferencial em todos os estádios clínicos, porém com padrões diferenciados. No estágio I, ele se mostrou superexpresso nos casos metastáticos, tendência que também foi observada no estágio III, mas de maneira menos expressiva no estágio II. A expressão alterada do miR-21 tem sido uma das mais exploradas e descritas em diversos tipos de câncer nos últimos anos (88–90), sendo este miRNA considerado um promotor da oncogênese, devido ao genes alvos que são regulados por ele. No trabalho realizado com material parafinado de mama em Hui *et al* (75), os autores também indicaram este miR como superexpresso.

De maneira semelhante, em outros estudos de expressão de microRNAs em amostras de carcinoma mamário, a superexpressão do miR-21 foi encontrada em Si *et al* 2007 (91); Yan *et al* 2008 (71); e em Qian *et al* 2009 (92), sendo que neste último trabalho, os autores ainda apontam uma complexa interação entre o miR-21 e a via TGF-β. Utilizando ensaios

funcionais em linhagens e animais, Zhu *et al* 2008 (93), revelaram que o miR-21 tem como alvos supressores tumorais PTEN; TPM1 (*tropomyosin 1*); PDCD4 (*programmed cell death 4*) e *Masp1* envolvidos na regulação de migração e invasão, pela via PI3K-Akt e outros mecanismos ainda não muito claros.

Sendo assim, os resultados de nosso trabalho corroboram com relatos já descritos na literatura a respeito de alguns miRNAs, que comumente apresentam expressão alterada na maioria dos tumores sólidos, incluindo o câncer de mama.

Na tentativa de confirmar nossos achados do rastreamento por *microarray*, utilizamos a técnica de qRT-PCR nos mesmos pacientes. Para realizar um PCR quantitativo robusto, analisamos criteriosamente parâmetros como extração do RNA total; controle de integridade; síntese de cDNA; desenho do primer e normalização dos dados (94). Em relação à normalização, utilizamos o método *gold standard*, fazendo uso de miRNAs endógenos como referência (95), escolhidos com base em um estudo piloto prévio (96) realizado pelo nosso grupo de pesquisa. No entanto, notamos que os dados de expressão da fase de *microarray* não foram reproduzíveis para todos os miRNAs analisados. Uma possível explicação, diz respeito aos desafios intrínsecos da técnica de qRT-PCR, como destacados em Benes *et al* 2010 (94), tais desafios incluem o pequeno tamanho dos microRNAs maduros (em torno de 22 nucleotídeos); a heterogeneidade do conteúdo GC, o que resulta em um intervalo relativamente grande de temperaturas de anelamento de duplex de ácidos nucleicos na população de miRNAs (94).

Por meio das reação de PCR em Tempo Real conseguimos confirmar a expressão diferencial de dois miRNAs, o miR-183 para as amostras de pacientes do estadiamento clínico II e o miR-494 apenas para as amostras de pacientes do estadiamento I. Estes dois miRNAs se apresentaram superexpressos nas amostras de tecido tumoral que desenvolveram metástase ao longo do tempo, quando comparados às amostras de tecido tumoral que não desenvolveram metástase ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,05$).

Com a finalidade de verificar qual a probabilidade do padrão de expressão destes miRNAs estar associada a um pior prognóstico dos 64 pacientes incluídos neste estudo, avaliamos a expressão do miR-183, miR-494 e sua associação com o prognóstico em cada paciente.

As análises iniciais mostraram que o aumento da expressão do miRNA-183 e do miRNA-494 em combinação foi correlacionada a um pior prognóstico. Embora a análise separada destes microRNAs mostre esta mesma inclinação, não obtivemos valor de *p* estatisticamente significativo. No entanto, alguns trabalhos corroboram para esta tendência.

Em (97) Yang *et al* 2013, os autores investigaram biomarcadores para detecção precoce de carcinoma esofágico de células escamosas, e relataram o miR-183 apresentando níveis elevados no tumor em comparação ao tecido tumoral adjacente. Os autores não apresentaram uma curva de sobrevida, porém, este microRNA apresentou significância na análise de regressão logística para risco de câncer esofágico. De maneira semelhante, Hannafon *et al* 2011 (98) detectaram superexpressão deste microRNA ao comparar câncer de mama pré-invasivo e tecido normal. Assim, somando-se nossos achados aos dados da literatura e ao fato do miR-183 ter como alvos, supressores tumorais (EGR1 e PTEN) (99), acreditamos que esta molécula possa ser um potencial oncomir, exercendo papéis diferentes em diferentes tipos de câncer.

O miR-494, como já dito anteriormente, também atua regulando o importante supressor tumoral PTEN em diferentes tipos de tumores, e ainda sabe-se pouco sobre a função deste no contexto do câncer de mama. De maneira impressionante, nossos resultados mostraram que ao combinar estes dois microRNAs como biomarcadores prognósticos, conseguimos aumentar o valor da área sob a curva, obtendo um resultado estatisticamente significativo e revelando um achado original que abre espaço para novos estudos da importância e dos papéis exercidos por estes microRNAs na progressão do carcinoma mamário.

Na meta-análise de Vosa *et al* 2013 (100), diversos estudos de expressão de miRNAs em pulmão foram investigados. Em concordância, foram destacados os miRs 21 e 183 como superexpressos e importantes reguladores de processos oncogênicos. Apesar do trabalho não ter mostrado correlações estatísticas com análises de sobrevida e risco relativo, os autores enfatizam a importância destas análises para o ponto de vista clínico.

Em Shaefer *et al* 2010 (101), tumores de próstata e tecido adjacente normal foram comparados por *microarray* e qRT-PCR, e novamente o miR-183 revelou-se superexpresso. Além disso, a combinação deste com outros miRs elevou o poder da curva ROC, aumentando o valor de área sob a curva. Desta maneira, este estudo reforça o valor e potencial do uso de miRNAs como ferramentas de auxílio no prognóstico de pacientes.

A busca por biomarcadores específicos e funcionais capazes de diferenciar uma condição patológica de um estado normal, ou de auxiliar de maneira acurada no prognóstico do paciente é uma luta travada diariamente em muitos países. Identificar um padrão de expressão consistente de microRNAs biomarcadores passíveis de uso na clínica e obtidos de material parafinado seria uma grande revolução, considerando que muitas vezes este é o único tipo de material disponível para análise. De fato, grandes esforços nesta área já resultaram em plataformas aplicáveis à rotina clínica como *Oncotype Dx*; *MapQuant Dx*; entre outras (102). Embora a mineração do potencial de uso de microRNAs ainda esteja no início, e existam limitações, nossos resultados são entusiasmantes para a contribuição do conhecimento neste campo de pesquisa.

Apesar de muitas dificuldades existirem no caminho, a simples possibilidade de descobrir biomarcadores úteis para a clínica e contribuir para a melhora do diagnóstico ou tratamento de uma patologia, que acomete milhares de mulheres todos os anos, instiga trabalhos como este, que levantam novas ideias para investigação neste campo crescente da medicina molecular, e contribuem para uma melhor elucidação dos processos moleculares envolvidos no carcinoma mamário.

Embora não tenha sido um objetivo esmiuçar vias do câncer e os papéis dos microRNAs nas mesmas, este estudo revelou alguns genes alvos interessantes e interações moleculares que sugerem mais estudos nesta direção, com destaque para os miR-494 e miR-183, que apresentam pouca literatura até o momento. Além disso, considerando a originalidade dos nossos resultados, com este estudo conseguimos apontar dois miRNAs (miR-183 e miR-494) como potenciais marcadores de risco para o desenvolvimento de metástase no câncer de mama.

Sabidamente este trabalho abre perspectivas sem precedentes para uma melhor elucidação do papel destes miRNAs no desenvolvimento do câncer de mama considerando que muitas questões permanecem sem resposta no que concerne as vias reguladas por estes microRNAs destacados e seus mecanismos de ação no desenvolvimento do câncer de mama.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Neste trabalho, conseguimos identificar 7 miRNAs diferencialmente expressos e comuns aos casos metastáticos de todos os estádios clínicos, o que evidencia sua importância no processo de progressão e metástase do câncer de mama.
- Por meio de uma análise com curvas ROC, foi possível identificar perfis de expressão de miRNAs candidatos a biomarcadores de metástase para os diferentes estadiamentos clínicos estudados (ECI, ECII, ECIII) em pacientes com câncer de mama.
- Foi possível confirmar a superexpressão do miR-183 nos casos metastáticos do estadiamento clínico II, bem como a superexpressão do miR-494 nos casos metastáticos do ECIII por meio da tecnologia de qRT-PCR em tempo real. Tais miRNAs regulam a expressão de vários genes supressores tumorais além de outros genes importantes para o processo de invasão e metástase.
- Conseguimos correlacionar os achados moleculares com os dados clínico-patológicos. Por meio da associação do padrão de expressão de miR-183 com miR-494 e miR-21, foi possível associar o aumento da expressão destes marcadores a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama no estadiamento clínico II.
- Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para identificação de novos potenciais biomarcadores de metástase no câncer de mama.
- A originalidade de nossos achados abre perspectivas para novas investigações a respeito do papel dos miRNAs 183 e 494 na progressão no câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Estimativa 2012 Incidência de Câncer no Brasil* [Internet]. 2012 [citado 10 de novembro de 2012]. Recuperado de: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>
2. Ferreira, CG. **Oncologia Molecular**. 2a edição. 2010.
3. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. **Breast Cancer Res**. 2010;12(5):R68.
4. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. **Cancer Biol. Ther**. novembro de 2010;10(10):955–60.
5. American Cancer Society. *Breast Cancer Facts*. **Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012**. Atlanta; 2012.
6. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. **Br J Cancer**. 31 de outubro de 2005;93(9):1046–52.
7. Lester SC, Bose S, Chen Y-Y, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. *Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast*. **Arch Pathol Lab Med**. janeiro de 2009;133(1):15–25.
8. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. **J. Natl. Cancer Inst**. 20 de maio de 2009;101(10):736–50.
9. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. **Ann. Oncol**. agosto de 2011;22(8):1736–47.
10. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. *Treatment of breast cancer*. **Am Fam Physician**. 1 de junho de 2010;81(11):1339–46.
11. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. *Molecular portraits of human breast tumours*. **Nature**. 17 de agosto de 2000;406(6797):747–52.
12. Prat A, Perou CM. *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. **Mol Oncol**. fevereiro de 2011;5(1):5–23.
13. Sørli 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*. **PNAS**. 7 de agosto de 2003;100(14):8418–23.

14. Duarte M, Longatto Filho A, Schmitt FC. *Angiogenesis, haemostasis and cancer: new paradigms and old concerns*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. dezembro de 2007;43(6):441–9.
15. Yamazaki Y, Morita T. *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. **Mol. Divers**. novembro de 2006;10(4):515–27.
16. Timoshenko AV, Rastogi S, Lala PK. *Migration-promoting role of VEGF-C and VEGF-C binding receptors in human breast cancer cells*. **Br. J. Cancer**. 22 de outubro de 2007;97(8):1090–8.
17. Neufeld G, Kessler O. *Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis*. **Cancer Metastasis Rev**. setembro de 2006;25(3):373–85.
18. 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*. **J. Pathol**. outubro de 2004;204(2):140–6.
19. 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*. **Int. J. Cancer**. 20 de agosto de 2004;111(2):184–91.
20. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmén C, et al. *Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia*. **Blood**. 15 de junho de 2005;105(12):4642–8.
21. Liersch R, Detmar M. *Lymphangiogenesis in development and disease*. **Thromb. Haemost.** agosto de 2007;98(2):304–10.
22. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. *Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma*. **J. Pathol**. junho de 2005;206(2):170–7.
23. Witte MH, Jones K, Wilting J, Dictor M, Selg M, McHale N, et al. *Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology*. **Cancer Metastasis Rev**. junho de 2006;25(2):159–84.
24. Harvey NL, Oliver G. *Choose your fate: artery, vein or lymphatic vessel?* **Curr. Opin. Genet. Dev**. outubro de 2004;14(5):499–505.
25. Oliver G. *Lymphatic vasculature development*. **Nat. Rev. Immunol**. janeiro de 2004;4(1):35–45.
26. Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. *LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis*. **Trends Immunol**. junho de 2001;22(6):317–21.
27. Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Borges J, et al. *The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues*. **FASEB J**. agosto de 2002;16(10):1271–3.

28. Kaiserling E. *Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic pathology.* **Pathologe.** setembro de 2004;25(5):362–74.
29. Longatto Filho A, Oliveira TG, Pinheiro C, de Carvalho MB, Curioni OA, Mercante AM da C, et al. *How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis?* **World J Surg Oncol.** 11 de dezembro de 2007;5:140.
30. Wong SY, Hynes RO. *Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide?* **Cell Cycle.** abril de 2006;5(8):812–7.
31. Boneberg E-M, Legler DF, Hoefler MM, Ohlschlegel C, Steininger H, Füzesi L, et al. *Angiogenesis and lymphangiogenesis are downregulated in primary breast cancer.* **Br. J. Cancer.** 18 de agosto de 2009;101(4):605–14.
32. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. *Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response.* **Nat. Rev. Cancer.** junho de 2008;8(6):425–37.
33. Tse JC, Kalluri R. *Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment.* **J. Cell. Biochem.** 1 de julho de 2007;101(4):816–29.
34. Valastyan S, Weinberg RA. *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.* **Cell.** 14 de outubro de 2011;147(2):275–92.
35. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer.* **Cell.** 7 de janeiro de 2000;100(1):57–70.
36. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 4 de março de 2011;144(5):646–74.
37. Paget S. *The distribution of secondary growths in cancer of the breast.* 1889. **Cancer Metastasis Rev.** agosto de 1989;8(2):98–101.
38. Langley RR, Fidler IJ. *The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs.* **Int. J. Cancer.** 1 de junho de 2011;128(11):2527–35.
39. Guise T. *Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment.* **Semin. Oncol.** outubro de 2010;37 Suppl 2:S2–14.
40. Lorusso G, Rüegg C. *New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis.* **Semin. Cancer Biol.** junho de 2012;22(3):226–33.
41. Sassen S, Miska EA, Caldas C. *MicroRNA—implications for cancer.* **Virchows Arch.** janeiro de 2008;452(1):1–10.
42. Calin GA, Croce CM. *MicroRNA signatures in human cancers.* **Nat. Rev. Cancer.** novembro de 2006;6(11):857–66.

43. He L, Hannon GJ. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. **Nat. Rev. Genet.** julho de 2004;5(7):522–31.
44. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. *Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression*. **Mamm. Genome.** março de 2006;17(3):189–202.
45. Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. *MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer*. **Clin Epigenetics.** agosto de 2011;2(2):171–85.
46. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. **Mol. Cell.** 23 de maio de 2008;30(4):460–71.
47. Breving K, Esquela-Kerscher A. *The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** agosto de 2010;42(8):1316–29.
48. Da Sacco L, Masotti A. *Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region*. **Int J Mol Sci.** 2012;14(1):480–95.
49. Hwang H-W, Mendell JT. *MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis*. **Br. J. Cancer.** 27 de março de 2006;94(6):776–80.
50. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. **Nature.** 11 de outubro de 2007;449(7163):682–8.
51. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. *MicroRNAs and metastases—the neuroblastoma link*. **Cancer Biol. Ther.** março de 2010;9(6):453–4.
52. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. **Nature.** 10 de janeiro de 2008;451(7175):147–52.
53. Negrini M, Calin GA. *Breast cancer metastasis: a microRNA story*. **Breast Cancer Res.** 2008;10(2):203.
54. 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*. **Nat. Cell Biol.** fevereiro de 2008;10(2):202–10.
55. Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, de Weerd V, Boersma AWM, et al. *Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2 de setembro de 2008;105(35):13021–6.
56. Zhu W, Liu X, He J, Chen D, Hunag Y, Zhang YK. *Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study*. **BMC Cancer.** 2011;11:393.
57. Valastyan S. *Roles of microRNAs and other non-coding RNAs in breast cancer metastasis*. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** março de 2012;17(1):23–32.

58. Sørli 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.* 11 de setembro de 2001;98(19):10869–74.
59. William C. S. Cho. *MicroRNAs in Cancer Translational Research* [Internet]. 1a edição. 2011 [citado 17 de novembro de 2012]. Recuperado de: <http://www.springer.com/biomed/book/978-94-007-0297-4>
60. Setoyama T, Ling H, Natsugoe S, Calin GA. *Non-coding RNAs for medical practice in oncology. Keio J Med.* 2011;60(4):106–13.
61. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 7 ed. **Wiley-Blackwell**; 2010.
62. Carey LA PC. *Race, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. JAMA.* 7 de junho de 2006;295(21):2492–502.
63. Bengtsson H, Hössjer O. *Methodological study of affine transformations of gene expression data with proposed robust non-parametric multi-dimensional normalization method. BMC Bioinformatics.* 1 de março de 2006;7(1):100.
64. 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.* 15 de novembro de 2006;22(22):2825–7.
65. Jeffery IB, Higgins DG, Culhane AC. *Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. BMC Bioinformatics.* 26 de julho de 2006;7(1):359.
66. Grund B, Sabin C. *Analysis of Biomarker Data: logs, odds ratios and ROC curves. Curr Opin HIV AIDS.* novembro de 2010;5(6):473–9.
67. Starmans MHW, Fung G, Steck H, Wouters BG, Lambin P. *A Simple but Highly Effective Approach to Evaluate the Prognostic Performance of Gene Expression Signatures. PLoS ONE.* 7 de dezembro de 2011;6(12):e28320.
68. Fawcett T. *An introduction to ROC analysis. Pattern Recognition Letters.* junho de 2006;27(8):861–74.
69. Fan J, Upadhye S, Worster A. *Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. CJEM.* janeiro de 2006;8(1):19–20.
70. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. *ROCR: visualizing classifier performance in R. Bioinformatics.* 15 de outubro de 2005;21(20):3940–1.
71. Yan L-X, Huang X-F, Shao Q, Huang M-Y, Deng L, Wu Q-L, et al. *MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. RNA.* novembro de 2008;14(11):2348–60.

72. Ozgün A, Karagoz B, Bilgi O, Tuncel T, Baloglu H, Kandemir EG. *MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer*. **Onkologie**. 2013;36(3):115–8.
73. Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ. *Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells*. **BMC Cancer**. 2010;10:502.
74. Ofir M, Hacoheh D, Ginsberg D. *MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E*. **Mol. Cancer Res.** abril de 2011;9(4):440–7.
75. Hui ABY, Shi W, Boutros PC, Miller N, Pintilie M, Fyles T, et al. *Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues*. **Lab. Invest.** maio de 2009;89(5):597–606.
76. Chung J-Y, Braunschweig T, Hewitt SM. *Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue*. **Diagn. Mol. Pathol.** dezembro de 2006;15(4):229–36.
77. Benchekroun M, DeGraw J, Gao J, Sun L, von Boguslawsky K, Leminen A, et al. *Impact of fixative on recovery of mRNA from paraffin-embedded tissue*. **Diagn. Mol. Pathol.** junho de 2004;13(2):116–25.
78. Zhang X, Chen J, Radcliffe T, Lebrun DP, Tron VA, Feilotter H. *An array-based analysis of microRNA expression comparing matched frozen and formalin-fixed paraffin-embedded human tissue samples*. **J Mol Diagn.** novembro de 2008;10(6):513–9.
79. Jaiswal R, Luk F, Gong J, Mathys J-M, Grau GER, Bebawy M. *Microparticle conferred microRNA profiles--implications in the transfer and dominance of cancer traits*. **Mol. Cancer**. 2012;11:37.
80. Jones CI, Zabolotskaya MV, King AJ, Stewart HJS, Horne GA, Chevassut TJ, et al. *Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma*. **Br. J. Cancer**. 4 de dezembro de 2012;107(12):1987–96.
81. 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.** 9 de julho de 2010;285(28):21496–507.
82. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. **Cell**. 11 de março de 2005;120(5):635–47.
83. Sakurai M, Miki Y, Masuda M, Hata S, Shibahara Y, Hirakawa H, et al. *LIN28: a regulator of tumor-suppressing activity of let-7 microRNA in human breast cancer*. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** setembro de 2012;131(3-5):101–6.
84. Kim S-J, Shin J-Y, Lee K-D, Bae Y-K, Sung KW, Nam SJ, et al. *MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7*. **Breast cancer research: BCR**. 18 de janeiro de 2012;14(1):R14.

85. Yun J, Frankenberger CA, Kuo W-L, Boelens MC, Eves EM, Cheng N, et al. *Signalling pathway for RKIP and Let-7 regulates and predicts metastatic breast cancer*. **EMBO J.** 2 de novembro de 2011;30(21):4500–14.
86. 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.** 1 de junho de 2012;188(11):5500–10.
87. 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.** 14 de dezembro de 2012;287(51):42695–707.
88. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 14 de fevereiro de 2006;103(7):2257–61.
89. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. *MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma*. **JAMA.** 30 de janeiro de 2008;299(4):425–36.
90. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, et al. *Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype*. **Am. J. Pathol.** setembro de 2008;173(3):856–64.
91. Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y. *miR-21-mediated tumor growth*. **Oncogene.** 26 de abril de 2007;26(19):2799–803.
92. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, et al. *High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1*. **Breast Cancer Res. Treat.** setembro de 2009;117(1):131–40.
93. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y. *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis*. **Cell Res.** março de 2008;18(3):350–9.
94. Benes V, Castoldi M. *Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available*. **Methods.** abril de 2010;50(4):244–9.
95. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. **Genome Biol.** 18 de junho de 2002;3(7):R34.
96. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. *A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization*. **Genome Biol.** 2009;10(6):R64.
97. Yang M, Liu R, Sheng J, Liao J, Wang Y, Pan E, et al. *Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma*. **Oncol. Rep.** janeiro de 2013;29(1):169–76.

98. Hannafon BN, Sebastiani P, de Las Morenas A, Lu J, Rosenberg CL. *Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer*. **Breast Cancer Research: BCR**. 4 de março de 2011;13(2):R24.
99. Sarver AL, Li L, Subramanian S. *MicroRNA miR-183 Functions as an Oncogene by Targeting the Transcription Factor EGR1 and Promoting Tumor Cell Migration*. **Cancer Res**. 12 de janeiro de 2010;70(23):9570–80.
100. Võsa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T. *Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer*. **Int. J. Cancer**. 15 de junho de 2013;132(12):2884–93.
101. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf H-J, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. *Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma*. **Int. J. Cancer**. 1 de março de 2010;126(5):1166–76.
102. Reis-Filho JS, Pusztai L. *Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction*. **Lancet**. 19 de novembro de 2011;378(9805):1812–23.

ANEXOS

Anexo A - Ficha de Coleta de prontuário

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MIRNAS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS POR MICROARRAYS

1	Identificação	1	
2	Nome	2	
3	Registro hospitalar	3	
4	Data de nascimento DD/MM/AAAA	4	
5	Data da primeira consulta no Hospital DD/MM/AAAA	5	
6	Cidade	6	
7	Estado	7	
8	Estado Civil 1- Solteiro; 2- Casado / União estável; 3- Divorciado / Separado; 4- Viúvo; 99- Ignorado	8	
9	Cor 1- Branca; 2- Negra; 3- Parda; 4- Amarela; 99- ignorado	9	
10	Escolaridade 1- Analfabeto; 2- Fundamental incompleto; 3- Fundamental completo; 4- Médio incompleto; 5- Médio completo; 6- Superior incompleto; 7- Superior completo; 99- Ignorado	10	
11	Tabagismo 0- Não; 1- Sim, atual, 2- Sim, passado; 3- Sim, não especificado; 99- Ignorado	11	
12	Etilismo 0- Não; 1- Sim, atual, 2- Sim, passado; 3- Sim, não especificado; 99- Ignorado	12	
13	Idade da menarca	13	
14	Anticoncepcional oral 0- Não; 1- Sim, atual, 2- Sim, passado; 3- Sim, não especificado; 99- Ignorado	14	
15	Idade da primeira gravidez ANOS	15	
16	Número de filhos	16	
17	Antecedente de câncer familiar 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	17	
18	Antecedente de câncer mama familiar 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	18	
19	Estadiamento cT 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4; 5- T5; 99- Tx	19	
20	Estadiamento cN 0- N0; 1- N1; 2- N2; 3- N3; 99- Nx	20	
21	Estadiamento cM 0- M0; 1- M1; 99- Mx	21	
22	Estadiamento clínico 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 99- Ignorado	22	

23	Tratamento cirúrgico 0- Não; 1- Quadrantectomia; 2- Mastectomia; 99- Ignorado	23	
24	Data da cirurgia DD/MM/AAAA	24	
25	Idade na cirurgia ANOS	25	
26	Tipo histológico 1- Ductal invasivo; 2- Lobular invasivo	26	
27	Número de linfonodos dissecados	27	
28	Número de linfonodos positivos	28	
29	RE 0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	29	
30	RP 0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	30	
31	Her2 0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	31	
32	Estadiamento pT 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4; 5- T5; 99- Tx	32	
33	Estadiamento pN 0- N0; 1- N1; 2- N2; 3- N3; 99- Nx	33	
34	Estadiamento pM 0- M0; 1- M1; 99- Mx	34	
35	Estadiamento patológico 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 99- Ignorado	35	
36	Tratamento quimioterápico 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	36	
37	Data do início do tratamento quimioterápico DD/MM/AAAA	37	
38	Data do término do tratamento quimioterápico DD/MM/AAAA	38	
39	Recidiva locorregional 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	39	
40	Data da recidiva locorregional DD/MM/AAAA	40	
41	Metástase à distância 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	41	
42	Data da recidiva à distância DD/MM/AAAA	42	
43	Local metástase à distância - Cerebral 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	43	
44	Local metástase à distância - Hepática 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	44	
45	Local metástase à distância - Óssea 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	45	
46	Local metástase à distância - Pulmonar 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	46	
47	Local metástase à distância - Outras Descreva	47	
48	Estado atual da paciente 1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Óbito por CA; 4- Óbito por outra causa; 99- Ignorado	48	
49	Perda de seguimento 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	49	
50	Data da última informação (consulta ou óbito)	50	

		DD/MM/AAAA		
51	Data do levantamento	DD/MM/AAAA	51	
52	Número ap		52	

Anexo B - Aprovação pelo Comitê de Ética**Comitê de Ética em Pesquisa**
CEP

Para: Marcia Maria C. M. Silveira
De Dr. Eduardo José Paton
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 22.09.2010

Projeto de Pesquisa: **362/2010**

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou a resposta as pendências referentes ao projeto de pesquisa **362/2010** “**Avaliação do papel dos microRNAs diferencialmente expressos no controle de invasão e metástase do câncer de mama**” e decidiu que o mesmo encontra-se **Aprovado**.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP, relatórios semestral e final, bem como possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo a fim de se fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Dr. Eduardo José Paton
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos

Anexo C - Submissão de artigo para revista

De: Breast Cancer Research Editorial <editorial@breast-cancer-research.com>

Para: Dr Marcia Marques <mmcmsilveira@gmail.com>

CC: Dr Marcia Marques <mmcmsilveira@gmail.com>, "Augusto L.F. Marino" <augusto.marino@gmail.com>, "Adriane F. Evangelista" <adriane.feijo@gmail.com>, Taciane Macedo <macedo.taciane@gmail.com>, "Rene A.C. Vieira" <reneacv@terra.com.br>, "Ligia M. Kerr" <kerr.l@hotmail.com>, Adhemar Longatto Filho <longatto16@hotmail.com>, "Henrique C.S. Silveira" <henriquecssilveira@gmail.com>, "Márcia M.C. Marques" <mmcmsilveira@gmail.com>

Data: 17 de setembro de 2013 17:53

assunto: 1298462021084792 MicroRNA expression as risk biomarkers of breast cancer metastasis in a retrospective case cohort study.

Sep 17, 2013

Dear Dr Marques

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review. If deemed suitable, we will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within six weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@breast-cancer-research.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The Breast Cancer Research Editorial Team

Tel: [+44 \(0\) 20 3192 2013](tel:+44(0)2031922013)

Facsimile: [+44 \(0\) 20 3192 2011](tel:+44(0)2031922011)

e-mail: editorial@breast-cancer-research.com

Web: <http://breast-cancer-research.com/>

Anexo D - Artigo científico oriundo desta dissertação

MicroRNA expression as risk biomarkers of breast cancer metastasis in a retrospective case cohort study.

Augusto L. F. Marino ¹, Adriane F. Evangelista ¹, Taciane Macedo ¹, René A. C. Vieira ², Ligia M. Kerr ³, Adhemar Longatto-Filho ¹, Henrique C. S. Silveira ¹, Marcia M. C. Marques ^{1,4}

¹ *Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, CEP: 14784-400, Barretos, SP, Brazil.*

² *Department of Mastology and Breast Reconstruction, Barretos Cancer Hospital, CEP: 14784-400, Barretos, SP, Brazil.*

³ *Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, CEP: 14784-400, Barretos, SP, Brazil.*

⁴ *Barretos School of Health Sciences - FACISB, Barretos, São Paulo, Brazil.*

*Corresponding author:

Marques MMC

Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, 18783-175, Barretos, SP, Brazil. Phone: +55 17 3321 6600 extension: 7057.

E-mail addresses:

ALFM: augusto.marino@gmail.com

AFE: adriane.feijo@gmail.com

TM: macedo.taciane@gmail.com

RACV: reneacv@terra.com.br

LMK: kerr.l@hotmail.com

ALF: longatto16@hotmail.com

HCSS: henriquecssilveira@gmail.com

MMCM: mmcmsilveira@gmail.com

Abstract

Introduction: MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA molecules involved in post-transcriptional gene regulation and have recently been shown to play a role in cancer metastasis. In solid tumors, especially breast cancer, alterations in miRNA expression contribute to cancer pathogenesis, including metastasis. Considering the emerging role of miRNAs in metastasis, the identification of predictive markers is necessary to further the understanding of stage-specific breast cancer development. This is a retrospective analysis that aimed to identify molecular biomarkers related to distant breast cancer metastasis development.

Methods: A retrospective case cohort study was performed in 64 breast cancer patients treated during the period from 1998-2001. The case group (n=29) consisted of patients with a poor prognosis who presented with breast cancer recurrence or metastasis during follow up. The control group (n=35) consisted of a random sample of patients with a good prognosis who did not develop breast cancer recurrence or metastasis. These patient groups were stratified according to TNM clinical stage (CS) I, II and III, and the main clinical features of the patients were homogeneous. miRNA profiling was performed using formalin-fixed, paraffin-embedded tumors. Biomarkers related to metastatic potential were identified independent of clinical stage, and a cutoff point was selected based on the optimal sensitivity and specificity (ROC curve). Finally, a hazard risk analysis of these biomarkers was performed to evaluate their relation to metastatic potential.

Results: miRNA expression profiling identified several miRNAs that were either specific and shared across all clinical stages ($p \leq 0.05$). Among these, we identified miRNAs previously associated with cell motility (let-7 family), cell proliferation and invasion (hsa-miR-16 and has-miR-205) and distant metastasis (hsa-miR-21). In addition, hsa-miR-494 and hsa-miR-21 were up-regulated in metastatic cases of CSI and II. Furthermore, the combination of the 3 miRNAs identified for CSII (hsa-miR-494, hsa-miR-183 and hsa-miR-21) was significant and were a more effective risk marker compared to the single miRNAs.

Conclusions: Women with metastatic breast cancer, especially CSII, presented up-regulated levels of miR-183, miR-494 and miR-21, which were associated with a poor prognosis. These miRNAs therefore represent new risk biomarkers of breast cancer metastasis and may be useful for future targeted therapies.

Keywords: breast cancer, metastasis, microRNAs, biomarkers, molecular profile, retrospective study.

Introduction

Breast cancer is the most frequent neoplasia after skin malignancies, representing the second most common cancer-related mortality in women [1]. Although TNM staging provides important clinical prognostic information [2], mammary tumors are known to be biologically heterogeneous with regard to therapeutic responses [3] as well as molecular profiling. For example, these tumors can be characterized as luminal A, luminal B, basal-like, human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)-overexpressing or claudin-low [4], and this profiling provides additional molecular prognostic markers. In addition, a recent study demonstrated that the microRNA expression signature appears to provide a better characterization of cancer subtypes than transcriptional profiles and may therefore represent a new classification system for breast cancer [5].

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs of 19-25 nt that control a wide array of physiological and pathological processes by modulating the expression of their cognate target genes through cleaving mRNA molecules or inhibiting their translation [6]. Most cancer tissues are archived as formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples, and microRNAs are promising biomarkers because they are a stable form of RNA. Moreover, recent studies have shown a good correlation between microRNA samples from frozen and FFPE sections [7,8].

MiRNAs regulate key biological processes such as development, differentiation, stress response, apoptosis and proliferation [9-11] and are consequently implicated in several diseases including cancer [12-14].

Iorio et al. [15] demonstrated the influence of miRNA deregulation in the development of breast cancer in several tissues and lineages, and other studies have correlated miRNA profiles with mRNA subtypes, particularly with regard to estrogen

receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 status [16,17]. In addition, specific miRNAs have been associated with steps of the metastasis cascade, such as micrometastasis, local invasion, intravasation and metastatic colonization [18]. However, in practice, few miRNA expression signatures have been shown to correlate with breast cancer metastasis, and although the epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a critical event for metastasis from carcinomas, few studies evaluating miRNAs during EMT have been performed in breast cancer [19-21].

The main goal of this study was to identify miRNA biomarkers of breast cancer metastasis. Using a collection of FFPE samples, we selected clinically homogeneous samples, and we paired metastatic and non-metastatic patients according to tumor grade. Using this strategy, we detected, with improved precision, miRNA biomarkers that could characterize metastasis irrespective of clinical staging as well as stage-specific biomarkers.

Methods

Study population

A retrospective case cohort study [22] was performed in patients with invasive breast cancer (ductal or lobular) without metastasis at diagnosis (clinical stage I, II and III) who had previously received treatment at Barretos Cancer Hospital between 1998 and 2001. In this study, the case group consisted of patients with a poor prognosis who developed breast cancer recurrence and/or metastasis during follow up.

The control group consisted of a random sample of patients who did not develop breast cancer recurrence and/or metastasis and had a good prognosis. The control group presented the same apparent risk and length of follow up period as the case group. The groups also had a similar distribution of clinical staging (CS) according to TNM classification

(TNM 7th edition) [2]. All patients were treated at the same institution with same treatment protocol and received regular follow-up assessments at the Department of Mastology and Reconstructive Surgery at Barretos Cancer Hospital, Barretos, Sao Paulo, Brazil. Patients were excluded if they had a second primary tumor, an insufficient blocked tumor or the absence of high-quality miRNA for extraction. The study was approved by the local ethics committee, protocol #362/2010.

Pathologic evaluation

The same pathologist reviewed all of the medical records. Immunohistochemistry evaluation was performed in all cases, including the assessment of ER and PR status and the expression of Ki-67, Her2 and cytokeratin 5/6. ER status was evaluated using the Pathway anti-Her-2 790-2991 monoclonal antibody (Ventana Medical Systems, Roche Diagnosis, Tucson, Arizona 85755, USA) at a dilution of 1:200.

PR status was evaluated using the Rabbit monoclonal antibody clone SP1 at a dilution of 1:600. Ki-67 expression was evaluated using the monoclonal antibody MIB-1 (Dako, Sao Paulo, Brazil) at a dilution of 1:200. Her2 status was evaluated using the mouse antibody clone 4B5 (Ventana Medical Systems, Roche Diagnosis, Tucson, Arizona 85755, USA) at a 1:2,000 dilution.

The cytokeratin 5/6 status was evaluated using the mouse monoclonal D5/16B4 (Dako, Sao Paulo, Brazil) at a 1:100 dilution. ER and PR expression was considered positive when 1% of tumor cells showed positive staining. The Ki-67 cutoff value was 14%. For Her2 semi-quantitative immunohistochemistry (2+ and 3+), the DISH test was performed using Her2 Dako K5331(Dako, Sao Paulo, Brazil). Basal-like tumors were characterized according to

triple-negative receptor status and positive C5/6 status. We applied immunohistochemistry molecular characteristic subgroups based on previous reports [23,24].

Patients and case selection

A total of 64 patients were selected, including 29 in the case group and 35 in the control group. Ductal invasive carcinoma represented 76.6% of the group histology. The average patient age was 53.1 years (29-95), and the average tumor size was 3.1 cm (1.0-8.5 cm).

The groups were homogeneous, and there were no differences between the variables selected prior to pairing. Table 1 summarizes the main patient features, with the associated p-values from the Fisher test using SPSS software. Using a t-test for independent variables, there were no differences between groups related to tumor size (mean 3.24x3.04; $p=0.592$) or age (mean 49.1x56.4; $p=0.07$). After pairing and pathologic classification, we observed that only the PR status differed between the groups (Table 1).

The mean group follow-up duration was 82.0 months (5.1-162 months); excluding the case group, this period was 120.6 months. At the end of the study, 25/29 patients in the case group had died of cancer, while the others remained alive with tumor recurrence.

Total RNA isolation from FFPE sections

FFPE samples were submitted to a total RNA isolation protocol using the Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation kit (Life Technologies). The samples were initially treated with xylene, followed by double washing with absolute ethanol and proteinase K treatment at 50°C for 3 hours. Quantification was performed using a nanodrop ND-1000

spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE), and RNA quality was assessed using an Agilent Small RNA chip with a Bioanalyzer device (Agilent Technologies).

miRNA microarrays

The Agilent Human miRNA Microarray (8X15K - G4471A, Agilent Technologies) was used. A total of 100 ng of total RNA was hybridized using miRNA complete labeling and the Hyb Kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions. The reactions followed a 2-step preparation, represented by dephosphorylation and denaturation of the total RNA incorporated with Cy3 fluorochrome by the T4 ligase. The next steps included standard washing procedures and hybridization with microarrays slides. The images were scanned using an Agilent DNA microarray scanner with SureScan technology (Agilent Technologies).

miRNA microarray data analysis

The raw data were obtained using Feature Extraction software v.11.0 (Agilent Technologies) and submitted to R environment v. 2.15.0 (<http://www.r-project.org>) for further analysis. The median signals from the foreground and background were used. Following background subtraction and log₂ scale transformation, normalization was performed using the quantile method with the aroma light package [25]. Differentially expressed microRNAs were obtained by rank product analysis using the RankProd package [26], considering p-values and positive false predictions (pfp) ≤ 0.05 . The rank product analyses were separated according to clinical staging between groups (CSI-CSIM, CSII-CSIIM, CSIII-CSIIIM). Differentially expressed miRNAs were further ranked according to sensitivity and specificity to determine the best candidates between non-metastatic patients and

metastatic patients in a stage-specific manner. The criteria for biomarker selection included sensitivity and specificity values $\geq 80\%$, as determined using the ROCR package [27]. Differentially expressed microRNAs were clustered by Euclidian distance and average linkage using the heatmap.2 function of the gplots package.

Real-time PCR and disease-free survival analysis

Taqman microRNA assays (Life Technologies, Foster City, CA, USA) were used to confirm the microarray data. In brief, these reactions consist of reverse transcription with miRNA-specific primers in a real-time PCR reaction with Taqman probes. The reverse transcriptase reactions used in this study contained 10 ng of total RNA and utilized the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions, in a centrifuge (Eppendorf). All real-time PCR reactions were performed in triplicate in a 7900 HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems USA). All analysis procedures were performed in an R environment. The normalization step was performed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [28]. Cycle threshold (Ct) values from selected miRNA targets were subtracted from the Ct values of the endogenous small noncoding RNA control RNU48 (Control miRNA Assay, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). A subsequent $\Delta\Delta Ct$ value was calculated by subtracting metastatic ΔCt values from non-metastatic ones. The data cutoff for modulation (up/down) in each patient was estimated according to the threshold obtained after receiver operating characteristic (ROC) curve analysis using the ROCR package. To assess the combination of biomarkers, a general logistic model (glm) was performed prior to ROC analysis. MiRNA modulation (up/down) was used, and data from the first clinical evaluation until recurrence were considered for the non-parametric estimation of disease-free survival using the Kaplan-Meier method. Risk curves were used, and

comparisons were performed using the log-rank test and the Cox hazard model, considering p-values ≤ 0.05 . In multiple Cox analysis, each clinical variable, such as molecular subtype, TNM and histology (ductal and lobular), was compared separately with the miRNA expression. The survival R package was also used in this analysis [29].

Functional analysis

Target prediction was performed using the mirDIP interface (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>). In the present search, we selected at least 3 of 12 algorithms available for prediction. The targets were analyzed by functional analysis using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) version 6.7. This approach was used to identify significant biological processes and pathways that could be shared between targets of miRNAs of interest. A biological process or pathway was considered significant if it contained a minimum of 3 genes per category, featuring score values less than 0.05 including the Benjamini-Hochberg correction.

Results

The present study included 64 breast cancer patients, including non-metastatic patients (n=35) and those with metastatic recurrence or metastasis at follow up (n=29). The groups were stratified according to clinical staging (CS) as CSI, CSII and CSIII with the intention of identifying specific and shared miRNAs associated with metastasis. There were no differences between the groups before pairing with regard to CS; after pairing, the only difference between the groups was related to PR status (p=0.02) (Table I).

Table I. Clinical features related to clinical and pathologic variables related to the groups by chi-square.

Recurrence	Absent	Present	Total	p (χ^2)
------------	--------	---------	-------	----------------

 Selected variables before pairing

CS-TNM	EC I	9	4	13	0.385
	EC II	13	10	23	
	EC III	13	15	28	
CS-T (TNM)	T1	15	12	27	0.742
	T2	10	8	18	
	T3	6	3	9	
	T4	4	6	10	
CS-N (TNM)	N0	17	8	25	0.378
	N1	9	10	19	
	N2	5	5	10	
	N3	4	6	10	

Categorical variables observed after pairing

Histology	Ductal	30	19	49	0.078
	Lobular	5	10	15	
ER	ER +	21	13	34	0.226
	ER -	14	16	30	
PR	PR +	16	5	21	0.018
	PR -	19	24	43	
Her2	Her2 +	5	8	13	0.158
	Her2 -	30	21	51	
Molecular Subtypes	Luminal	23	13	36	0.265
	Basal like	9	11	20	
	Her2	3	5	8	

 ER = Estrogen receptor; PR = progesterone receptor

MiRNAs differentially expressed between non-metastatic and metastatic patients

The differentially expressed miRNAs (non-metastatic vs. metastatic groups) stratified according to clinical stage (CSI, CSII and CSIII) are shown in Table II and Figure 1. Seven microRNAs were identified in the metastatic group irrespective of clinical staging (hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-miR-1308, hsa-miR-21, hsa-miR-494 and hsa-miR-923_v12.0; Figure 2). Of these, hsa-miR-494 and hsa-miR-21 were selected for further analysis using real-time PCR.

The optimal biomarkers were ranked according to sensitivity and specificity values \geq 80%. The clusters resulting from this analysis are represented in Figure 3, revealing miRNAs highly specific for the metastatic process. The miRNA hsa-miR-183 (CSII) was also selected for further analysis.

Table II. Differentially expressed miRNAs between non-metastatic and metastatic groups of patients from CSI, CSII and CSIII.

CSI			
microRNA	P.value	pfp	modulation
hsa-let-7a	0.00001	0.0045	up
hsa-let-7b	0.00001	0.0011	up
hsa-let-7c	0.00001	0.0212	up
hsa-miR-1225-3p	1.00E-04	0.0496	up
hsa-miR-1231	0.00001	0.005	up
hsa-miR-1308	0.00001	0.0133	down
hsa-miR-1914	0.00001	0.00001	up
hsa-miR-21	0.00001	0.0174	up
hsa-miR-328	0.00001	0.0233	up
hsa-miR-494	5.00E-05	0.0274	up
hsa-miR-553	1.00E-04	0.033	down

hsa-miR-923_v12.0	0.00001	0.008	down
CSII			
ebv-miR-BART17-5p	1.00E-04	0.0212	down
hcmv-miR-UL70-3p	0.00001	0.0024	up
hsa-let-7a	1.00E-04	0.0093	down
hsa-let-7b	5.00E-05	0.0131	down
hsa-let-7c	0.00035	0.03415	up
hsa-miR-1202	4.00E-04	0.03895	up
hsa-miR-1207-5p	0.00001	0.0039	up
hsa-miR-1225-5p	2.00E-04	0.02215	up
hsa-miR-1246	0.00001	0.00001	up
hsa-miR-125b	1.00E-04	0.0122	up
hsa-miR-1260	0.00001	0.00195	down
hsa-miR-1268	0.00001	8.00E-04	up
hsa-miR-1274a	0.00001	0.0059	down
hsa-miR-1274b	0.00001	0.00001	down
hsa-miR-1288	1.00E-04	0.0149	up
hsa-miR-1290	5.00E-05	0.0075	up
hsa-miR-1308	0.00001	0.00695	up
hsa-miR-150*	4.00E-04	0.0358	up
hsa-miR-16	0.00015	0.02465	down
hsa-miR-1826	2.00E-04	0.0305	down
hsa-miR-183	1.00E-04	0.0125	up
hsa-miR-186*	2.00E-04	0.0339	down
hsa-miR-1914*	0.00001	0.0021	up
hsa-miR-1915	0.00001	0.0015	up
hsa-miR-200c	2.00E-04	0.022	up
hsa-miR-205	1.00E-04	0.0243	down
hsa-miR-21	1.00E-04	0.0106	down
hsa-miR-23a	0.00001	0.0043	up
hsa-miR-27a	1.00E-04	0.0123	up

hsa-miR-29c	1.00E-04	0.0121	down
hsa-miR-301a	2.00E-04	0.0419	down
hsa-miR-424	1.00E-04	0.0155	up
hsa-miR-494	0.00001	0.0103	down
hsa-miR-572	3.00E-04	0.03065	up
hsa-miR-575	3.00E-04	0.0308	up
hsa-miR-630	5.00E-04	0.0425	up
hsa-miR-638	0.00001	0.0054	up
hsa-miR-663	2.00E-04	0.02005	up
hsa-miR-720	0.00001	0.00001	down
hsa-miR-923_v12.0	0.00001	0.00435	up
hsa-miR-940	0.00001	0.0037	up
jcv-miR-J1-3p	3.00E-04	0.0296	up
kshv-miR-K12-3	2.00E-04	0.0183	up

CSIII

ebv-miR-BART12	0.00001	0.0058	up
ebv-miR-BART13	2.00E-04	0.02065	down
ebv-miR-BART19-3p	4.00E-04	0.0297	down
hsa-let-7a	0.00001	0.0017	down
hsa-let-7b	0.00001	0.00375	up
hsa-let-7c	0.00015	0.025	up
hsa-let-7f	1.00E-04	0.0148	down
hsa-let-7g*	6.00E-04	0.0438	down
hsa-miR-103	3.00E-04	0.0245	down
hsa-miR-106b	4.00E-04	0.0317	down
hsa-miR-107	3.00E-04	0.0233	down
hsa-miR-1202	2.00E-04	0.0291	up
hsa-miR-1207-5p	0.00001	0.00435	up
hsa-miR-1225-5p	4.00E-04	0.03915	down
hsa-miR-1236	6.00E-04	0.0427	NA
hsa-miR-1246	0.00001	0.00001	down

hsa-miR-1260	0.00035	0.0302	down
hsa-miR-1268	1.00E-04	0.01215	down
hsa-miR-1290	2.00E-04	0.0207	down
hsa-miR-1303	3.00E-04	0.0276	down
hsa-miR-1305	0.00025	0.0305	up
hsa-miR-1308	0.00001	0.00115	down
hsa-miR-140-3p	4.00E-04	0.029	down
hsa-miR-1470	7.00E-04	0.0489	down
hsa-miR-155	7.00E-04	0.0483	down
hsa-miR-15b	1.00E-04	0.0079	down
hsa-miR-16	0.00001	0.00245	down
hsa-miR-1826	0.00001	0.00015	down
hsa-miR-188-5p	0.00045	0.0446	up
hsa-miR-1915	1.00E-04	0.01355	down
hsa-miR-196a	2.00E-04	0.0251	up
hsa-miR-199a-3p	3.00E-04	0.03115	up
hsa-miR-200a	7.00E-04	0.0493	down
hsa-miR-205	0.00001	0.02755	down
hsa-miR-21	0.00001	0.0013	down
hsa-miR-217	4.00E-04	0.0432	up
hsa-miR-26a	1.00E-04	0.0152	down
hsa-miR-26b	3.00E-04	0.0248	down
hsa-miR-27a	8.00E-04	0.0498	down
hsa-miR-29a	2.00E-04	0.016	down
hsa-miR-302d*	5.00E-04	0.0403	down
hsa-miR-30b	0.00025	0.02305	down
hsa-miR-324-3p	6.00E-04	0.0453	down
hsa-miR-328	0.00015	0.0165	down
hsa-miR-342-3p	3.00E-04	0.0272	down
hsa-miR-375	6.00E-04	0.0415	down
hsa-miR-424*	5.00E-04	0.0351	down

hsa-miR-494	0.00001	9.00E-04	down
hsa-miR-512-5p	0.00001	0.0076	up
hsa-miR-513a-5p	1.00E-04	0.0151	down
hsa-miR-513b	3.00E-04	0.0245	down
hsa-miR-539	0.00001	0.0064	up
hsa-miR-548f	5.00E-04	0.0488	up
hsa-miR-559	2.00E-04	0.0265	up
hsa-miR-575	1.00E-04	0.0103	up
hsa-miR-590-3p	4.00E-04	0.0427	up
hsa-miR-630	4.00E-04	0.0449	up
hsa-miR-638	2.00E-04	0.027	up
hsa-miR-657	8.00E-04	0.0499	down
hsa-miR-663	1.00E-04	0.0148	down
hsa-miR-720	0.00001	0.00001	up
hsa-miR-874	8.00E-04	0.0498	down
hsa-miR-923_v12.0	1.00E-04	0.0129	up
hsa-miR-92b	5.00E-04	0.0366	down
hsa-miR-93	2.00E-04	0.0193	down
hsa-miR-939	3.00E-04	0.0279	down
kshv-miR-K12-3	3.00E-04	0.0279	down

Figure 1 - Heatmaps of all miRNAs differentially expressed stratified according to clinical staging. Figure 1A represents non-metastatic vs. metastatic patients in CSI; Figure 1B in CSII and Figure 1C in CSIII.

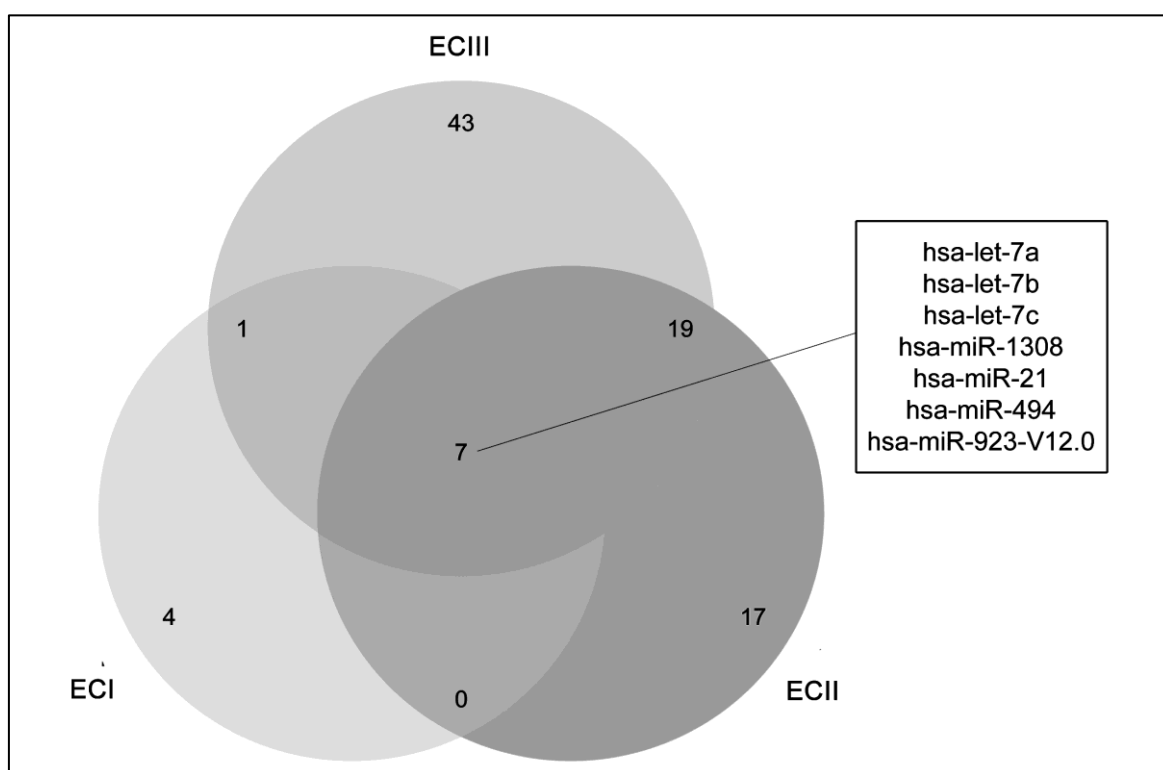


Figure 2 - Venn diagram showing differentially expressed number genes after Rank Products analysis between ECI, ECII and ECIII non-metastatic and metastatic paired groups. The seven genes shared between all the analyses are represented.

The best biomarkers were ranked according to sensitivity and specificity $\geq 80\%$. The clusters resulted from this analysis are represented in Figure 3, showing miRNAs highly specific of metastatic process. The miRNA hsa-miR-183 (CSII) was also selected for further analysis.

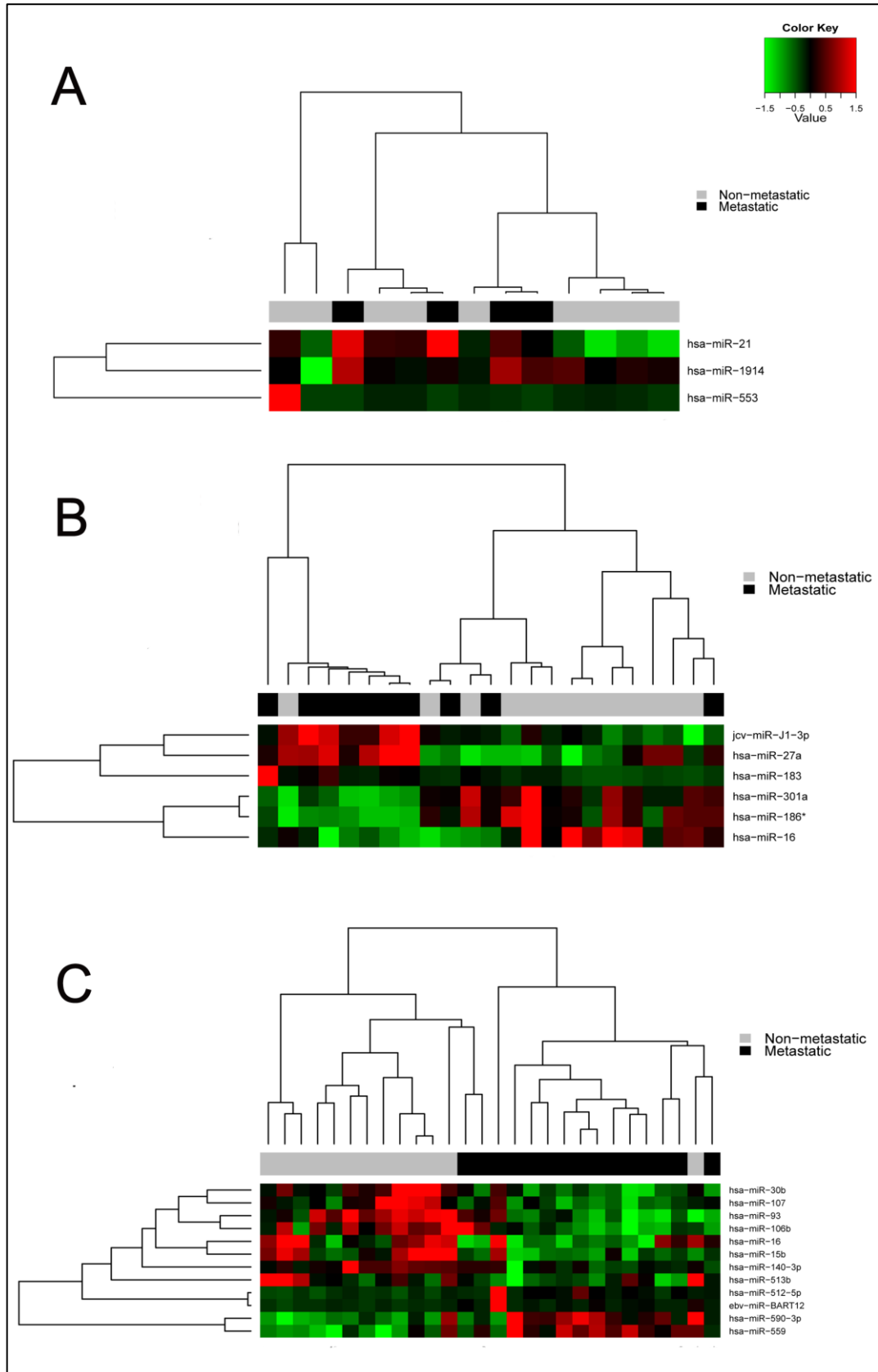


Figure 3 - Heatmaps of the best biomarkers stratified according to clinical staging. Figure 1A represents non-metastatic vs. metastatic patients in CSI; Figure 1B in CSII and Figure 1C in CSIII.

Relative risk analysis

MiRNA expression levels of the 64 patients used in microarray were accessed by real-time PCR for relative risk analysis. The primers used are represented in Table III.

Table III - Primers used for real-time PCR confirmation.

microRNA	Accession number	Sequence
RNU 48	001006	GATGACCCCAGGTA ACTCTGAGTGTGTCGCTG ATGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC
hsa-miRNA-183	002269	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
hsa-miRNA-494	002365	UGAAACAUACACGGGAAACCUC
hsa-miRNA-21	000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

The three microRNAs selected for further PCR real-time share important biological categories, especially regarding phosphoprotein and kinase protein associated functions, and as shown in Figure 4.

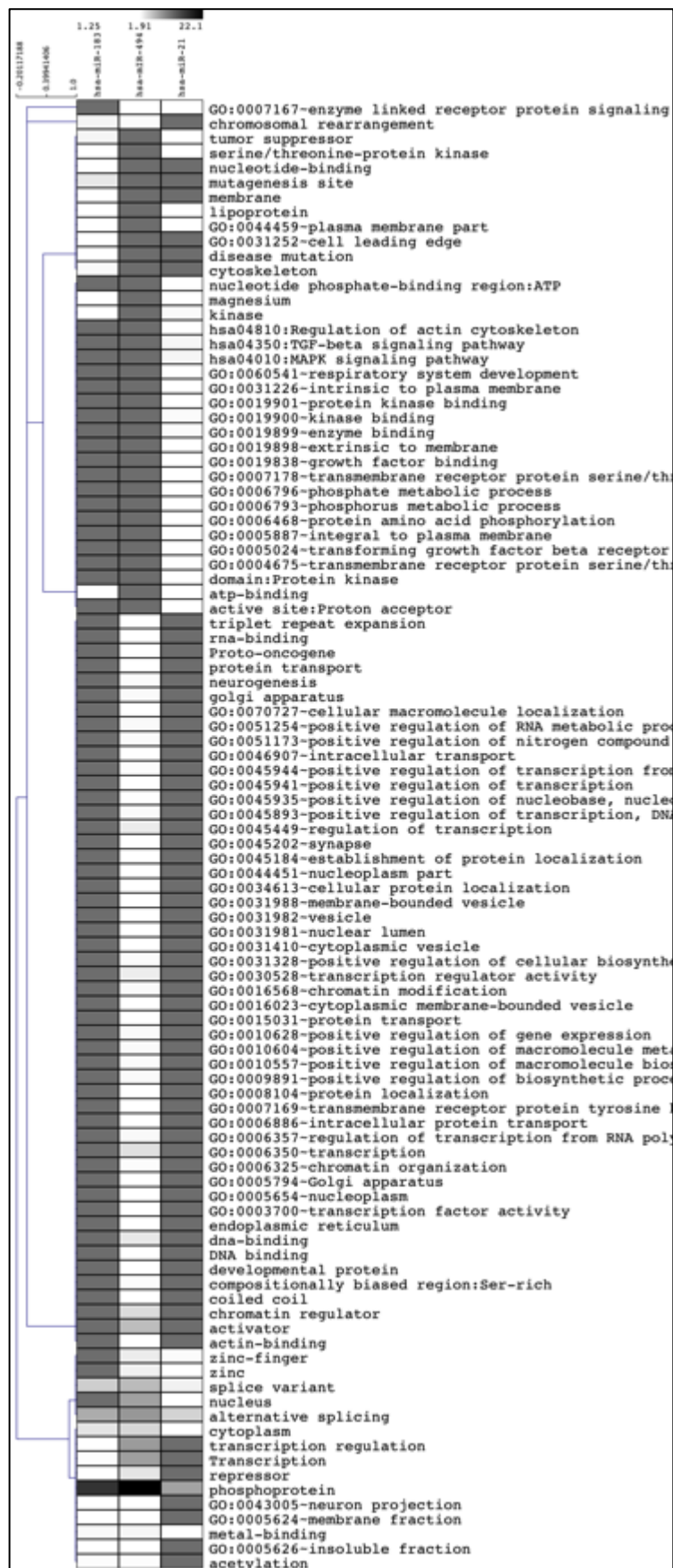


Figure 4 - Heatmap representing the DAVID significant categories of targets of hsa-miR-21, hsa-miR-183 and hsa-miR494, respectively.

ROC curve was used to select the threshold value for miRNA modulation of quantitative values obtained by real-time PCR. The AUC, sensitivity and specificity are represented in Table IV.

Table IV - ROC curve analysis for Real-time PCR threshold value determination of miRNAs alone and in combination.

microRNA	Threshold			
	value	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)
miR21	1,89	0,438	30	75
miR183	4,708	0,769	75	80
miR494	1,688	0,400	30	75
miR21 + miR494	0,497	0,600	50	75
miR21 + miR183	0,431	0,823	90	70
miR183 + miR494	0,354	0,830	70	75
miR183 + miR21 + miR494	0,567	0,838	75	80

Relative risk curves using recurrence data as event are shown in Figure 5. Because of the small size of CSI, it was not possible to perform such analysis. In CSII, the miRNAs hsa-miR-183 was the only miRNA that were significant alone by log-rank test (p value = 0.03). In contrast, hsa-miR-21 and hsa-miR-494 showed no statistical significance (p values of 0.88 and 0.86, respectively). After combination of the three miRNAs, they presented significant influence of up-regulation in metastatic events (p value=0.002). The combination of hsa-miR-21 with hsa-miR-494 was not significant after log-rank test (p=0.123). The other combinations were significant (hsa-miR-21 with hsa-miR-183 presented p value = 0.004 and hsa-miR-183 with hsa-miR-494 presented p value=0.001). In CSIII we did not find significant results (data not shown). The multivariate analysis and relative risk is shown in the Table V.

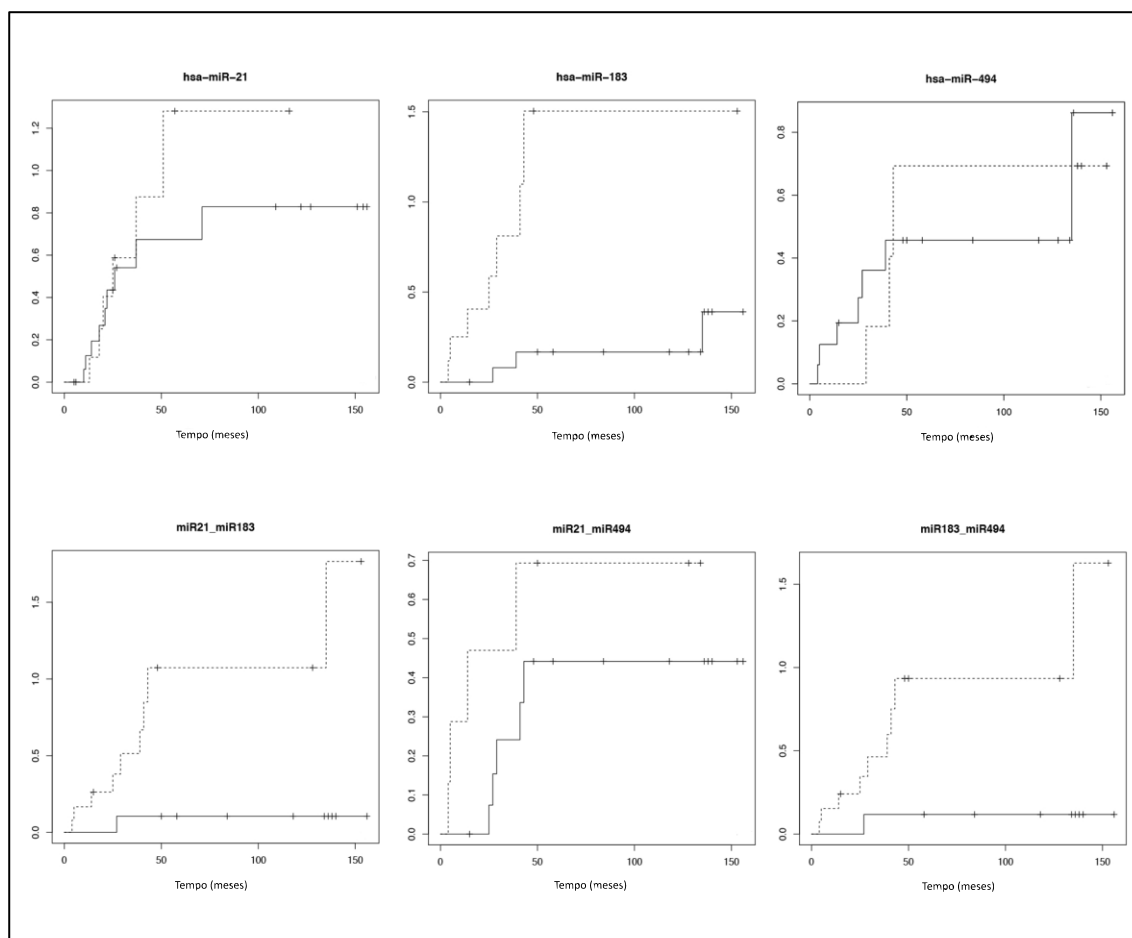


Figure 5 - Relative risk curves of the best biomarkers. In A, B and C, miRNAs miR-21, miR-183 and miR-494 were analyzed separately. In D, the combination between miR-21 and miR-183. In D between miR 21 and miR 494. In F, miR-183 and miR-494 combination. Up represent dotted lines and down continuous line.

Table V. Multivariate Cox hazard models used in combination with the modulation of the three microRNAs of interest (hsa-miR21, hsa-miR494 and hsa-miR-183)

Covariate		pvalue	HR (95% CI)
Histology	Ductal	0.1105	0.2964 (0.06656-1.32)
	Other		1
	Up		5.8382 (1.44192-23.64)
miRNA regulation	Down	0.0134	1
Histology	Lobular	0.1105	3.374 (0.7577-15.02)
	Other		1
	Up		5.8382 (1.44192-23.64)
miRNA regulation	Down	0.0134	1

T2	T2	0.41401	1.7449 (0.4589-6.635)
	Other		1
	Up		7.584 (1.7856-32.207)
miRNA regulation	Down	0.00604	1
NO	NO	0.30875	0.4978 (0.130-1.907)
	Other		1
	Up		6.6417 (1.664-26.503)
miRNA regulation	Down	0.00733	1
N1	N1	0.30875	2.009 (0.5244-7.695)
	Other		1
	Up		6.6417 (1.664-26.503)
miRNA regulation	Down	0.00733	1
Molecular Subtype	Luminal	0.99957	0.9996 (0.2747-3.638)
	Other		1
	Up		6.3045 (1.5768-25.208)
miRNA regulation	Down	0.00921	1
Molecular Subtype	Basal	0.21919	0.3512 (0.06617-1.864)
	Other		1
	Up		8.3112 (1.91848-36.006)
miRNA regulation	Down	0.00464	1
Molecular Subtype	Her2	0.08739	3.766 (0.8233-17.23)
	Other		1
	Up		8.332 (1.8785-36.95)
miRNA regulation	Down	0.00528	1

Discussion

Despite recent findings regarding the role of microRNAs in metastasis, the molecular mechanisms of breast cancer progression remain incompletely understood. For example, the prognostic significance of tumor grade in this type of cancer remains unknown, as well as the molecular mechanisms for why small tumors from CSI (as well as those from CSII and CSIII) can lead to metastasis. In the current study, although there were difficulties associated with

obtaining sufficient numbers of CSI metastatic samples, the similarities between tumors of different clinical stages were considered. We performed a retrospective study and identified new biomarkers of breast cancer metastasis that are both shared and specific to clinical stages I-III. The first application of microarray-based gene expression profiling analysis to the study of breast cancer consisted of disease assessment at the molecular level. In addition, class-prediction studies aim to identify miRNA predictors that could be applicable to all patients with breast cancer, with the goal of separating patients according to prognosis and selecting candidate genes for metastasis during follow up [30].

The Mamaprint, Oncotype DX and Breast Cancer Index selected patients who were ER positive, and the Veridez 76-gene study evaluated patients without lymph node metastases [30]. The present case cohort study evaluated patients with invasive breast cancer based on metastasis development and selected microRNAs related to metastasis development independent of lymph node or hormonal status.

The Oncotype DX study initially evaluated a retrospective cohort, and the genes of interest were selected using a univariate Cox analysis with a median of 15.1 years of follow up [31]. The Mamaprint study evaluated the odds of developing distant metastases after a 5-year follow-up period [32]. We performed a case cohort study with a control group that had a median follow-up duration of 10 years, which decreased the bias related to patient class migration.

The main prognostic factors related to breast cancer are summarized according to the TNM classification; therefore, at diagnosis, the tumor size, lymph node status and distant metastases represent the main prognostic factors. Another independent prognostic factor is the gene signature; however, this is not easy to evaluate in clinical practice. Although a semi-quantitative assessment of ER, PR, HER2 and Ki67 status using immunohistochemistry is

frequently used in clinical practice, this method does not provide the true gene signature [30,33].

In our study, we standardized the cases and controls according to TNM classification, and we did not observe any differences between the groups (Table 1). Other variables included in the analysis were related to histology and immunohistochemistry markers. Although the PR status was different between the groups, this did not serve as a prognostic factor, which may be due to the limited number of patients evaluated or a possible bias associated with the group selection.

Considering recent findings regarding breast cancer metastasis, Valastyan [34] reviewed the role of microRNAs according to the steps of the metastatic cascade. In our study, miRNAs shared by clinical stages I-III were found in concordance with processes such as cell motility (let-7 family), cell proliferation and invasion (hsa-miR-16 and has-miR-205) and distant metastases (hsa-miR-21). Of these miRNAs, we chose to confirm hsa-miR-21 using real-time PCR because it is the most frequently reported miRNA in several types of solid cancers, representing a potential oncomir.

These miRNAs have been described as regulating oncogenes or tumor suppressor genes. The let-7 family appears to regulate the expression of *RAS* and *HMGA2* in breast cancer cells and is associated with several mechanisms of carcinogenesis, including EMT [35,36]. In addition, low let-7d expression is associated with low hsa-miR-205 expression in head-and-neck cancer [37], and it is known that *HER3* and *PTEN* are targets for both miRNAs [38,39]. Another *PTEN* regulator is hsa-miR-21, and there is evidence that hsa-miR-205 and hsa-miR-21 can act together to promote local invasion [18]. Finally, hsa-miR-16 was shown to regulate *BLC2* and *CCND1* and is considered important for micrometastasis formation [18,40]. In our study, we identified the miRNA hsa-miR-494 as a *PTEN* regulator.

The microRNA hsa-miR-494 targets several molecules relevant to cancer, including *PTEN*. Transfection studies have shown this miRNA to act as a master cell cycle regulator at the G1/S checkpoint by targeting *CDK6* [41] and at G2/M arrest by targeting *PLK1*, *PTTG1*, *CCNB1*, *CDC2*, *CDC20* and *TOP2A* [42], and this miRNA also affects cell proliferation in A549 lung cells by regulating *IGFBP1* and *IGF2* [43] and in gastrointestinal tumor cells by direct targeting *KIT* [44]. In addition, miR-494 also appears to have a role in TRAIL-induced apoptosis [45] as well as the immune system via its regulation of key transcription factors, such as interferon γ and TGF β 1 [46,47]. The evidence of its role in metastasis was demonstrated as an exosomal miRNA in premetastatic sites targeting cadherin-17 in mice [48]. Together, these data as well as the findings of the present study highlight this miRNA as a new interesting candidate for verification in metastatic breast cancer.

Supervised analysis, based on clinical staging stratification, identified hsa-miR-183 as the optimal microRNA with regard to sensitivity and specificity (Figure 3). Of these stage-specific microRNAs, miR-183, which was specific to CSII, is considered an oncogene because it targets *DKK3*, *SMAD4*, *EGR1*, *PTEN* and the PI3K pathway, and it is frequently described in breast cancer [49,50] as well as other reproductive system related-cancers such as prostate, ovarian and urothelial carcinomas [51]. Moreover, miR-183 has been considered a metastatic inhibitor by targeting ezrin [52] and lymph node metastasis in medullary thyroid carcinoma [53,54], and this miRNA was recently described as being involved in breast cancer progression [55]. Despite these findings, our study is the first to report the association between miR-183 and CSII patients.

Despite the fact that microRNAs hsa-miR-494 and hsa-miR-21 share important targets such as *PTEN*, this combination was not significant after the log-rank test for CSII or all clinical stages pooled together (data not shown). These miRNAs presented an increased risk

only when they were analyzed in combination with miR-183. Moreover, in regards to the molecular mechanisms shared by targets of these miRNAs (Figure 4), we identified phosphoproteins, specifically kinases, among both miRNA targets. For example, KIT and BCL6 were among the hsa-miR-494 proto-oncogenic targets, which represented a significant category with 34 genes, whereas tumor suppressors and apoptotic genes were more evident among hsa-miR-183 target genes, including PTEN, PDCD4 and BCL10, as well as tyrosine kinase signaling pathways (Figure 4).

The 3 miRNAs selected (hsa-miR-21, hsa-miR-494 and hsa-miR-183) share *PTEN* as a target, and this combination demonstrated an increased risk for metastasis (Figure 5), which suggests some potentially shared mechanism of action. Moreover, the Cox regression analysis showed that the risk of breast cancer metastasis was more likely to be related to miRNA expression and appeared to be independent of clinic pathological variables. In this study, a homogeneous population was intentionally selected to evaluate the effect of miRNA deregulation with increased efficacy. However, it will be necessary to perform further studies in larger populations to validate these findings. Together, our findings indicate that miRNAs can be independently associated with patient prognosis in breast cancer and may represent risk biomarkers for the development of breast cancer metastasis.

Further studies are necessary to understand the role of these new candidate risk biomarkers and the effects of the combination of these miRNAs in breast cancer metastasis, especially in CSII.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. **CA. Cancer J. Clin.** 2011 Apr;61(2):69–90.

2. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7 ed. **Wiley-Blackwell**; 2010.
3. Sandhu R, Parker JS, Jones WD, Livasy CA, Coleman WB. *Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy*. **Lab Med**. 2010 Jan 6;41(6):364–72.
4. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. *Molecular portraits of human breast tumours*. **Nature**. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
5. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. **Nature**. 2005 Jun 9;435(7043):834–8.
6. Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. **Cell**. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
7. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. *Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples*. **RNA**. 2007 Oct;13(10):1668–74.
8. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. *Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells*. **Bmc Biotechnol**. 2007;7:36.
9. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. *MicroRNAs and cell cycle regulation*. **Cell Cycle**. 2007 Sep 1;6(17):2127–32.
10. Harfe BD. *MicroRNAs in vertebrate development*. **Curr. Opin. Genet. Dev**. 2005 Aug;15(4):410–5.
11. Boehm M, Slack FJ. *MicroRNA control of lifespan and metabolism*. **Cell Cycle**. 2006 Apr;5(8):837–40.
12. Baltimore D, Boldin MP, O’Connell RM, Rao DS, Taganov KD. *MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function*. **Nat. Immunol**. 2008 Aug;9(8):839–45.
13. Ha T-Y. *MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease*. **Immune Netw**. 2011 Jun;11(3):135–54.
14. Garzon R, Calin GA, Croce CM. *MicroRNAs in Cancer*. **Annu. Rev. Med**. 2009;60:167–79.
15. Yang J, Weinberg RA. *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. **Dev. Cell**. 2008 Jun;14(6):818–29.
16. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. **Cancer Res**. 2005 Aug 15;65(16):7065–70.

17. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin S-F, Dunning MJ, et al. *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. **Genome Biol.** 2007;8(10):R214.
18. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumors*. **Nature.** 2012 Oct 4;490(7418):61–70.
19. Valastyan S. *Roles of microRNAs and other non-coding RNAs in breast cancer metastasis*. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.** 2012 Mar;17(1):23–32.
20. Rundle AG, Vineis P, Ahsan H. *Design options for molecular epidemiology research within cohort studies*. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 2005 Aug;14(8):1899–907.
21. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. **Jama J. Am. Med. Assoc.** 2006 Jun 7;295(21):2492–502.
22. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. **J. Natl. Cancer Inst.** 2009 May 20;101(10):736–50.
23. Bengtsson H, Hössjer O. *Methodological study of affine transformations of gene expression data with proposed robust non-parametric multi-dimensional normalization method*. **BMC Bioinformatics.** 2006;7:100.
24. 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 Nov 15;22(22):2825–7.
25. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. *ROCR: visualizing classifier performance in R*. **Bioinformatics.** 2005 Oct 15;21(20):3940–1.
26. Therneau T, Lumley T. *R: Survival analysis, including penalised likelihood*. 2011 [cited 2012 Nov 21]; Available from: <http://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/survival/html/00Index.html>
27. Reis-Filho JS, Pusztai L. *Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction*. **Lancet.** 2011 Nov 19;378(9805):1812–23.
28. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu M-L, et al. *Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes*. **Clin. Cancer Res.** 2005 Dec 15;11(24 Pt 1):8623–31.
29. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. **Nature.** 2002 Jan 31;415(6871):530–6.
30. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen*

- International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann. Oncol.* 2011 Aug;22(8):1736–47.
31. Watanabe S, Ueda Y, Akaboshi S, Hino Y, Sekita Y, Nakao M. *HMG2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. Am. J. Pathol.* 2009 Mar;174(3):854–68.
 32. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. *Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. Science.* 2007 Mar 16;315(5818):1576–9.
 33. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, et al. *Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. Am. J. Pathol.* 2009 Mar;174(3):736–45.
 34. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, et al. *microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2195–200.
 35. Qu C, Liang Z, Huang J, Zhao R, Su C, Wang S, et al. *MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. Cell Cycle.* 2012 Feb 15;11(4):785–96.
 36. Valastyan S. *Roles of microRNAs and other non-coding RNAs in breast cancer metastasis. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2012 Mar;17(1):23–32.
 37. Santhi WS, Prathibha R, Charles S, Anurup KG, Reshmi G, Ramachandran S, et al. *Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. Oral Oncol.* 2013 Jun;49(6):567–75.
 38. Olaru AV, Ghiaur G, Yamanaka S, Luvsanjav D, An F, Popescu I, et al. *MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint. Hepatol.* 2011 Dec;54(6):2089–98.
 39. Yamanaka S, Campbell NR, An F, Kuo SC, Potter JJ, Mezey E, et al. *Coordinated effects of microRNA-494 induce G2/M arrest in human cholangiocarcinoma. Cell Cycle.* 2012 Jul 15;11(14):2729–38.
 40. Ohdaira H, Sekiguchi M, Miyata K, Yoshida K. *MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. Cell Prolif.* 2012 Feb;45(1):32–8.
 41. Kim WK, Park M, Kim Y-K, Tae YK, Yang H-K, Lee JM, et al. *MicroRNA-494 Downregulates KIT and Inhibits Gastrointestinal Stromal Tumor Cell Proliferation. Clin. Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7584–94.
 42. Romano G, Acunzo M, Garofalo M, Di Leva G, Cascione L, Zanca C, et al. *MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012 Oct 9;109(41):16570–5.

43. Ohdaira H, Sasaki T, Yoshida K. *A subset of microRNAs potentially acts as a convergent hub for upstream transcription factors in cancer cells.* **Oncol. Rep.** 2010 Nov;24(5):1371–81.
44. 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.** [Internet]. 2012 Apr 27 [cited 2013 Apr 25]; Available from: <http://www.jimmunol.org/content/early/2012/04/27/jimmunol.1103505>
45. Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, et al. *microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer.* **Br. J. Cancer.** 2013 Mar 28;
46. Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S, et al. *A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells.* **J. Transl. Med.** 2013;11:57.
47. Lehmann U, Streichert T, Otto B, Albat C, Hasemeier B, Christgen H, et al. *Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer.* **Bmc Cancer.** 2010;10:109.
48. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, et al. *MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology.* **Cancer Sci.** 2011 Mar;102(3):522–9.
49. Wang G, Mao W, Zheng S. *MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells.* **Febs Lett.** 2008 Oct 29;582(25-26):3663–8.
50. Gundara JS, Zhao JT, Gill AJ, Clifton-Bligh R, Robinson BG, Delbridge L, et al. *Nodal metastasis microRNA expression correlates with the primary tumour in MTC.* **Anz J. Surg.** 2012 Oct 16.
51. Abraham D, Jackson N, Gundara JS, Zhao J, Gill AJ, Delbridge L, et al. *MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets.* **Clin. Cancer Res.** 2011 Jul 15;17(14):4772–81.
52. Giricz O, Reynolds PA, Ramnauth A, Liu C, Wang T, Stead L, et al. *Hsa-miR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity.* **J. Pathol.** 2012 Jan;226(1):108–19.