Danielle Pessôa Pereira

PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM TUMORES DA MAMA HEREDITÁRIOS DE PORTADORAS DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS EM *BRCA1* E *BRCA2*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira Co-Orientador: Prof. Dr. René Aloiso da Costa Vieira

Danielle Pessôa Pereira

PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM TUMORES DA MAMA HEREDITÁRIOS DE PORTADORAS DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS EM *BRCA1* E *BRCA2*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira Co-Orientador: Prof. Dr. René Aloiso da Costa Vieira

P436p Pereira, Danielle Pessôa.
Perfil de expressão de microRNAs em tumores da mama hereditários de portadoras de mutações patogênicas em BRCA1 e BRCA2. / Danielle Pessôa Pereira. - Barretos, SP 2019.
170 f. : il.
Orientadora: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira.
Coorientador: René Aloiso da Costa Vieira.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.
1. MicroRNAs. 2. Neoplasias da mama. 3. Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário. 4. Biomarcadores. 5. Diagnóstico diferencial. 6. Biologia computacional. I. Autor. II. Silveira, Márcia Maria Chiquitelli Marques. III. Vieira, René Aloiso da Costa. IV. Título.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570 Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bem como do Ministério Público do Trabalho (MPT). "Esta tese foi elaborada e está apresentada 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".

Dedico este trabalho, com toda a minha gratidão, ao meu pai, Joseilton, por todo amor, dedicação e incentivo contínuo à minha educação desde a minha infância. Ao meu companheiro amado, Raphael, pelo apoio incondicional e, especialmente, por estar sempre ao meu lado me motivando e acreditando em meu potencial desde sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao **Hospital de Amor**, primeiramente, por toda infraestrutura e incentivo sem igual à pesquisa no Brasil. Agradeço infinitamente a **Deus** por ter me dado o privilégio e a honra de ter conhecido e orgulhosamente pertencido a esta instituição que hoje amo tanto.

À minha orientadora, **Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira**, não somente pela oportunidade, paciência, confiança e orientação prestada para o desenvolvimento deste projeto, mas também pelo apoio e incentivo constante ao meu crescimento profissional e acadêmico. Levarei comigo todos os ensinamentos e lições sobre conduta e superação. Hoje sou uma pessoa mais capaz e preparada graças a você. Nunca esquecerei da minha "mãe científica". Meus eternos agradecimentos.

Ao meu co-orientador, **Dr. René Aloísio da Costa Vieira**, que me orientou em etapas cruciais do projeto com empenho, paciência e leveza. Obrigada por ter sido sempre solícito e por me ensinar tudo que sei sobre os aspectos clínicos e patológicos do câncer de mama.

À Dra. Adriane Feijó Evangelista, não somente pela dedicação prestada para a realização das infinitas análises de bioinformática (que coisa mais complicada!), mas também por me atender em momentos de desespero e frustração e sempre me relembrar que "tudo passa" e tem um fim. Você foi, sem dúvidas, a pessoa que mais colaborou e dedicou seu tempo para a realização deste projeto. Muito obrigada!

Ao **Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, pelo apoio científico, interesse e incentivo prestados durante todo o desenvolvimento do projeto.

À Dra. Edenir Inêz Palmero, pela colaboração imprescindível para a inclusão de pacientes pertencentes a famílias de alto risco para o câncer de mama hereditário. Agradeço pela disponibilidade, paciência e toda atenção prestada para que essa etapa fosse possível.

Aos **médicos patologistas**, Dr. Lucas Faria Abrahão Machado, Dra. Iara Viana Vidigal Santana e Dr. Vinicius Duval da Silva, pela paciência, tempo e auxílio dedicados para a seleção e coleta dos materiais biológicos.

Ao **Departamento de Patologia** do Hospital de Amor, especialmente ao setor de **Medicina Personalizada**. Obrigada, **Fabiana**, **Patrícia** e **Alexandra**, pelo empenho, profissionalismo e todo auxílio prestado para viabilizar a coleta do material biológico para a realização deste estudo.

Aos departamentos de **Registro Hospitalar de Câncer**, de **Oncogenética** de **Diagnóstico Molecular** do Hospital de Amor, por viabilizar etapas cruciais do projeto.

Ao **Biobanco** do Hospital de Amor, especialmente à **MsC. Ana Caroline Neuber**, pela atenção e auxílio no processamento das amostras biológicas.

Ao **Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM)** do Hospital de Amor, em especial aos biologistas **Dr. Renato, Dra. Ana Laus, MsC. André, Karina** e **Letícia Braga**, por todo suporte técnico-científico, disponibilidade e dedicação prestada para desenvolvimento deste e de tantos outros projetos. Sem vocês, não há CPOM!

Ao Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística do Hospital de Amor, especialmente ao Marco Antônio, pela atenção e tempo dedicados a me ensinar todas as análises estatísticas necessárias.

Aos membros das Bancas de Acompanhamento da tese, **Dra. Patricia Pintor dos Reis e ao Dr. Cristovam Scapulatempo Neto**, pelas valiosas e oportunas sugestões para o desenho e desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação** do Hospital de Amor, especialmente à **Secretaria de Pós-Graduação**, pela excelência e destreza em todos os atendimentos prestados durante o andamento deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Ministério Público do Trabalho (MPT) e ao Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador do Hospital de Amor, por todo apoio e incentivo financeiro.

À toda **minha família**, em especial ao meu pai **Joseilton**, uma das pessoas que mais acredita em meu potencial. Obrigada por entender, apoiar e incentivar todas as minhas escolhas pessoais e profissionais. Espero sempre ser digna do seu orgulho.

Ao meu marido **Raphael**, por toda compreensão, amor e apoio incondicional dedicados a mim e ao meu sonho de me tornar Doutora. Eu tenho muita sorte de tê-lo ao meu lado. Não poderia ter encontrado melhor companheiro, amigo e parceiro na vida. Peço desculpas pelos diversos momentos de ausência, de tensão e de desequilíbrio emocional durantes esses quatro anos. Você foi fundamental para eu realizar este sonho. Te amo!

À minha eterna e genuína amiga **Camila Farias Amorim**, que desde os tempos da faculdade me incentiva a sempre melhorar e me superar além do limite. Obrigada por sempre estar "por perto" e por toda atenção e carinho dedicados a mim nas horas mais difíceis. Gostaria que soubesse que me espelho na grande profissional que você se tornou. Tenho muito orgulho de ser a sua amiga. Nos vemos mundo afora, migles!

Às queridas mestres **Rhafaela Causin**, **Natalia Campacci** e **Caroline Rogeri**, pelas especiais e valiosas amizades que tive o prazer de conquistar ao longo destes quatros anos. Eu achava que, ao me mudar para o interior de São Paulo, me sentiria sozinha por estar longe dos meus familiares e amigos de muitos anos. Mas eu estava enganada! **Rhafa**, minha *lab partner*! Companheirismo é a melhor palavra para definir seu papel em minha vida. Sou muito grata por todo auxílio, apoio e ombro amigo dedicados a mim ao longo destes anos. Saiba que você é uma excelente profissional que tem um inquestionável futuro brilhante pela frente. E claro, é uma amiga de ouro! Por isso, como diria a Sandy, você "agora e sempre vai estar (pausa) inesquecível em mim". **Nati**, minha autêntica princesa da Disney! Você foi uma das grandes e doces surpresas que tive durante a pós-graduação. Obrigada pelas tenras, sábias e tantas palavras de conforto e superação, e por me transmitir boas energias ao sentir que eu as necessitava. Te considero um ser humano muito inteligente e evoluído, uma amizade que faço

questão de cultivar até o fim dos tempos. Parafraseando o célebre Ewan McGregor: "come what may, I'll love you until my dying day". **Carol**, jamais esquecerei que foi você a primeira pessoa que me recebeu de braços abertos (e cheia de sorrisos!) no CPOM. Agradeço por todos os momentos felizes e divertidos compartilhados ao longo destes anos. Você é mais que sensacional, você é incrível! Obrigada por me permitir ser a sua amiga, te adoro!

Aos demais amigos e colegas do CPOM, Wellington, Letícia Ferro, Ariane, Cintia, Murilo, Iza, Marcela, Karen, Elisa, Angela, Ana Laura, Paula Pastrez, Paula Felicio, Bruna Crivelari, Bruna Sorroche, Renan, Rebeca, Fernanda Munari, Mariana Bizarro, Weder, Aline Rocha, Renata, e Marina, por todos os momentos (descontraídos ou não!) que passamos juntos. Foi um prazer trabalhar e conviver com todos vocês!

Além da Pesquisa e da Ciência, a <u>Música</u> também me presenteou com um verdadeiro aprendizado. Obrigada, **Acordes Vocais**, coral que tive o privilégio de participar e compartilhar fortes emoções durante o meu Doutorado. Obrigada por me fazer lembrar a todo instante que, por trás de toda amostra biológica coletada e utilizada em pesquisa, existe um ser humano com histórias repletas de alegria, superação, tristeza, angústia e dor. Espero que continue por muitos anos levando alegria, alento e conforto aos pacientes do Hospital de Amor, sensibilizando e conscientizando colaboradores e membros da comunidade sobre a importância da Música como um instrumento de um tratamento mais humanizado. E, para não perder o costume: **"Valeu, Contraltos!"**.

A mesma Música também me presentou com grandes amizades. Obrigada, **Wellington**, **Cristiane**, **André**, **Renata Nóvoa**, **Angela** e **José**: o autoproclamado **Coral da Alegria**! Não importa o espaço e o tempo, todos vocês sempre terão um lugar especial guardado em meu coração. Quando lembrar de vocês, e de todas os momentos divertidos e de apoio emocional que compartilhamos, irei pensar no trecho da música *Va Pensiero*, de Verdi: "*Va*', *pensiero*, *sull'ali dorate*!". "Vá, pensamento, sobre asas douradas!", e levem minha saudade a afeto a meus grandes amigos. Na Música, construímos uma amizade que não terá fim. Obrigada! Ao final, acredito que palavras nunca não serão suficientes para expressar a minha tamanha gratidão a todos os profissionais envolvidos neste projeto, bem como aos familiares e amigos que apoiaram e facilitaram a minha caminhada. Muito obrigada a todos!

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos..."

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de mama	1
1.1.1	Carcinogênese da mama	1
1.1.2	Classificação histológica e molecular	2
1.1.3	Epidemiologia e fatores de risco	4
1.1.4	Câncer de mama hereditário	6
1.2	Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário	9
1.2.1	Aspectos clínicos e estimativas de risco	9
1.2.2	Aspectos patológicos	13
1.2.3	Aspectos moleculares dos genes BRCA1 e BRCA2	14
1.2.3.1	Estrutura e função biológica	14
1.2.3.2	Variantes patogênicas	17
1.2.4	Aconselhamento genético e diagnóstico molecular	19
1.2.5	Avaliação de risco e predição de mutações germinativas	21
1.3	MicroRNAs	24
1.3.1	Origem e função	24
1.3.2	Biogênese e mecanismos de regulação	25
1.3.3	Desregulação da expressão de microRNAs no câncer	30
1.3.4	MicroRNAs como biomarcadores no câncer de mama	31
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVO	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Delineamento do estudo	37
4.2	População de estudo	38

4.2.1	Descrição da casuística e critérios de elegibilidade	38
4.2.2	Coleta de dados clínicos e patológicos	40
4.3	Amostras teciduais	42
4.4	Extração e quantificação do RNA total	42
4.5	Análise da expressão de microRNAs	43
4.5.1	Ensaio <i>nCounter</i> da NanoString	43
4.5.2	Controle de qualidade	44
4.5.3	Normalização dos dados	45
4.5.4	Análise de expressão diferencial	46
4.6	Predição de alvos de microRNAs	46
4.7	Enriquecimento de vias biológicas	47
4.8	Análise estatística	47
4.9	Aspectos éticos	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Caracterização clinicopatológica da população de estudo	49

J.1	caracterização cimicopatologica da população de estudo	49
5.2	Determinação de assinaturas de expressão de microRNAs	50
5.2.1	Perfis de expressão diferencial entre tumores esporádicos e tecidos	
	normais	50
5.2.2	Perfis de expressão diferencial entre tumores hereditários e tecidos	
	normais	51
5.2.3	Identificação de microRNAs comuns e específicos entre tumores	
	hereditários e esporádicos.	52
5.2.4	Avaliação da acurácia dos miRNAs diferencialmente expressos entre	
	tumores hereditários e tecidos normais da mama.	53
5.2.5	Perfis de expressão diferencial entre tumores da mama hereditários	
	associados ao BRCA1, BRCA2 e BRCAX.	56
5.2.6	Identificação de potenciais biomarcadores para classificação de	
	tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX.	59
5.3	Predição de genes alvos e enriquecimento de vias biológicas	60

5.3.1	Alvos putativos e vias potencialmente reguladas por microRNAs em	
	tumores da mama hereditários	60
5.3.2 Alvos putativos e vias potencialmente reguladas por microRNAs em		
	tumores da mama BRCAX.	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	71
REFERÍ	ÈNCIAS	73
ANEXC	S	101
ANEXO A – Ficha de coleta de dados clínicos e patológicos.		101
ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa		107
ANEXC	C – Resultado sumarizado da pesquisa por variantes de nucleotídeo	
único e	em genes de alto risco para o câncer de mama a partir de amostra de uma	
pacien	te jovem com idade inferior a <35 anos e sem história familiar sugestiva	
de sínd	de síndrome HBOC. 1	
ANEXC	ANEXO D – Documento comprobatório da situação do artigo científico.	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Glândula mamária e sua população de células.	1
Figura 2 –	The hallmarks of cancer.	2
Figura 3 –	Frequências relativas das formas esporádica, familial e hereditária do câncer.	6
Figura 4 –	Proporção estimada dos casos de câncer de mama hereditário devido a alterações genéticas em genes de alta, moderada e baixa penetrância.	9
Figura 5 –	Representação das estruturas e dos domínios funcionais das proteínas BRCA1 e BRCA2.	15
Figura 6 –	Mecanismos moleculares envolvidos na recombinação homóloga.	16
Figura 7 –	Localização genômica dos microRNAs.	26
Figura 8 –	Biogênese dos microRNAs.	28
Figura 9 –	Delineamento experimental.	37
Figura 10 –	Fluxograma do processo de seleção de pacientes com câncer hereditário.	39
Figura 11 –	<i>Heat map</i> do agrupamento supervisionado dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores esporádicos e tecidos normais da mama.	51
Figura 12 –	Heat map do agrupamento supervisionado dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores hereditários e tecidos normais da mama.	52

Figura 13 –	Diagrama de Venn contendo a lista dos miRNAs diferencialmente	
	expressos compartilhados e exclusivos entre tumores	
	hereditários e esporádicos da mama.	53
Figura 14 –	Perfis de expressão de miRNAs entre tumores hereditários	

Figura 14 –Perfis de expressão de miRNAs entre tumores hereditários
associados ao BRCA1, BRCA2 e BRCAX.56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fatores de risco potenciais para o desenvolvimento do câncer de mama.	5
Tabela 2 –	Critérios preconizados pela ASCO para diagnóstico clínico da síndrome HBOC.	9
Tabela 3 –	Critérios preconizados pela NCCN para diagnóstico clínico da síndrome HBOC.	10
Tabela 4 –	Estimativas de risco de malignidade em indivíduos portadores de variantes patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2.	11
Tabela 5 –	Resumo das variáveis incorporadas em modelos de predição para mutações germinativas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .	22
Tabela 6 –	Classificação dos subtipos moleculares de acordo com a expressão de marcadores moleculares.	41
Tabela 7 –	Características clinicopatológicas das pacientes incluídas no estudo.	49
Tabela 8 –	Performance diagnóstica dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores da mama hereditários e tecidos normais da mama.	54
Tabela 9 –	Performance diagnóstica dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tipos de tumores hereditários (BRCA1, BRCA2 ou BRCAX) e tecidos normais da mama.	55
Tabela 10 –	Associação entre a expressão diferencial dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX e o subtipo molecular triplo-negativo.	58

Tabela 11 –	Performance diagnóstica dos miRNAs diferencialmente expressos	
	entre tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX.	59
Tabela 12 –	Enriquecimento de vias biológicas de miRNAs diferencialmente	
	expressos entre tumores hereditários e tecidos normais da	
	mama.	61
Tabela 13 –	Enriquecimento de vias biológicas para os miRNAs com expressão	
	aumentada e apontados como biomarcadores para tumores da	
	mama BRCAX.	62
Tabela 14 –	Enriquecimento de vias biológicas para os miRNAs com expressão	
	memo RECAV	62
		03

LISTA DE ABREVIATURAS

7MG	7 metil guanosina
Abraxas	BRCA1-A complex subunit Abraxas 1
AGO2	Araonaute 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene
ANOVA	Analysis of variance
ASCO	American Society of Clinical Oncoloay
AUC	Area under the curve
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BCRAT	Breast Cancer Risk Assessment Tool
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility gene
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility gene
BI-RADS	Breast imaging-reporting and data system
BIC	Breast Cancer Information Core
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
CASP3	Caspase 3
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
СК	Citoqueratina
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CSDC2	Cold-shock domain-containing protein C2
CtIP	C-terminal binding protein 1
CV	Coefficient value
DBD	DNA-binding domain
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
E3	Ubiquitina ligase E3
EGFR	Receptor de crescimento epidérmico
ENIGMA	Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant
ErbB	Erythroblastic oncogene B
Exp-5	Exportin-5
FGF	Fibroblast Growth Factor
FFPE	Fixed-formalin, embebbed paraffin
FOV	Field of views
FoxO	Forkhead box protein O

GAP	GTPase activating protein
GDP	guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GWAS	Genome-wide association studies
H2AX	H2A histone family member X
НВОС	Hereditary breast and ovarian cancer syndrome
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
JNK	Stress-activated protein kinase
LLC	Leucemia linfocítica crônica
МАРК	Mitogen-activated protein kinase
MPLA	Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification
MRE11	Double Strand Break Repair Nuclease
mIRNA	microRNA
miRISC	miRNA-induced silencing complex
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCI	National Cancer Institute
ncRNA	Non-coding RNA
NGS	next-generation sequencing
NIH	National Institutes of Health
NLS	Nuclear Localization Signal
ОВ	Oligosaccharides binding
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAZ	Piwi/Argonauta/Zwille
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
PCR	Polymerase chain reaction
РІЗК	Phosphoinositide 3-kinases
pre-miRNA	miRNA precursor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RCV	Risco acumulativo vital
RE	Receptores de estrogênio
RING	Ring Interesting New Gene
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RP	Receptores de progesterona
RT-PCR	Real-Time PCR
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SNP	Single nucleotide polymorphisms

SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STAT5B	Signal Transducer And Activator Of Transcription 5B
STK11	Serine/threonine kinase 11
stRNA	small temporal RNAs
tcRNA	translacional control RNAs
TGFRB2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
ТР53	Tumor Protein P53
UDLT	Unidade ducto lobular terminal
UTR	Untranslated region
WT	Wild-type
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
≥	Maior ou igual à
<	Menor que
≤	Menor ou igual à
±	Mais ou menos
μL	Microlitros
kb	kilo bases
kDa	kilo daltons
n	Número
ng	Nanogramas
nts	Nucleotídeos

RESUMO

Pereira DP. Perfil de expressão de microRNAs em tumores da mama hereditários de portadoras de mutações patogênicas em BRCA1 e BRCA2. **Tese (Doutorado).** Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2019.

JUSTIFICATIVA: MicroRNAs (miRNAs) são pequenas sequências de RNA não-codificantes envolvidas na regulação pós-transcricional de genes e têm sido implicadas em múltiplas vias associadas ao câncer. Diversos estudos têm demonstrado perfis distintos de expressão de miRNAs em uma ampla gama de tumores humanos, sugerindo que o perfil de expressão destas moléculas poderia ser utilizado para propósitos diagnósticos. A expressão aberrante de miRNAs tem sido frequentemente reportada no câncer de mama esporádico, mas poucos estudos focaram em determinar perfis de expressão no câncer de mama hereditário e investigar seus potenciais como biomarcadores. **OBJETIVOS**: Nós buscamos identificar perfis de expressão de miRNAs associadas com tumores da mama hereditários; (ii) avaliar seus potenciais como biomarcadores de diagnóstico; e (iii) analisar seus genes alvos putativos e vias biológicas possivelmente afetadas in silico. MATERIAIS E MÉTODOS: Nós analisamos 74 amostras FFPE de tecidos tumorais da mama de 43 pacientes com câncer hereditário (15 BRCA1; 14 BRCA2; and 14 BRCAX); 23 pacientes com câncer esporádico; e amostras de tecido normal de 8 pacientes saudáveis utilizando a tecnologia *nCounter* do NanoString. Análises de curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foram realizadas para avaliar a performance diagnóstica dos miRNAs diferencialmente expressos. Subsequentemente, nós realizamos uma análise de predição de alvos para cada miRNA diferencialmente expressos utilizando a plataforma miRDIP, seguido de análises de enriguecimento de vias no Reactome utilizando o software Cytoscape. RESULTADOS: Nós encontramos através da análise do perfil de expressão de miRNAs vários perfis que foram específicos para os tumores hereditários quando comparado aos tecidos normais da mama, totalizando 25 miRNAs diferencialmente expressos (fold change: >2.0; p valor:<0.05) considerados como biomarcadores potenciais para o câncer de mama hereditário (AUC: 0.81-0.95). A análise de bioinformática revelou que estes miRNAs compartilhavam genes alvos especialmente envolvidos com a proliferação celular. Nós também encontramos 8 miRNAs diferencialmente expressos entre tumores hereditários (BRCA1, BRCA2 and BRCAX), com uma expressiva desregulação em tumores da mama BRCAX. A análise de bioinformática revelou que estes miRNAs compartilhavam genes alvos envolvidos com as vias de sinalização MAPK, FoxO, e PI3K-Akt. **CONCLUSÕES**: Nossos achados indicaram que existem miRNAs especificamente desregulados no câncer de mama hereditário. Além disso, os tumores BRCAX apresentaram padrões distintos de expressão de miRNAs e puderam ser diferenciados dos tumores BRCA1 e BRCA2. Uma vez validada em coortes maiores e independentes, a avaliação da expressão destes miRNAs poderia ter um valor potencial como uma ferramenta diagnóstica complementar para detecção de pacientes com câncer de mama que poderiam se beneficiar do teste genético para rastreamento de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* e de manejo clínico personalizado.

PALAVRAS-CHAVES: MicroRNAs; Neoplasias da Mama; Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário; Biomarcadores; Diagnóstico Diferencial; Biologia Computacional.

ABSTRACT

Pereira DP. *microRNA expression profiling in hereditary breast tumors from BRCA1 and BRCA2pathogenic mutation carriers.* **Thesis (PhD's degree).** Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2019.

BACKGROUND: MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs involved in posttranscriptional gene expression regulation and have been implicated in multiple cancerrelated pathways. Several studies have found distinctive miRNA expression profiles in a wide range of human tumors, suggesting that miRNA profiling could be used for diagnostic purposes. Aberrant expression of miRNAs has been frequently reported in sporadic breast cancers (SBC), but few studies have focused on determining miRNA expression profiles in hereditary breast cancers (HBC) and investigate their potential as biomarkers. AIMS: We sought to (i) identify miRNA expression profiles associated with HBC; (ii) evaluate their potential role as diagnostic biomarkers; and (iii) analyze their putative target genes and possibly affected biological pathways in silico. MATERIALS AND METHODS: We analyzed 74 FFPE breast tumors samples obtained from 43 HBC (15 BRCA1; 14 BRCA2; and 14 BRCAX); 23 SBC patients, and 8 normal breast tissues (NBT) from healthy individuals using the nCounter NanoString technology. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analyses were performed to evaluate the diagnostic performance of differentially expressed miRNAs. Subsequently, we performed a target prediction analysis for each differentially expressed miRNA using miRDIP platform, followed by pathway enrichment analyses on Reactome using the Cytoscape software. **RESULTS**: We found through miRNA expression profiling several profiles that were specific to HBC compared to NBT, with a total of 25 differentially expressed miRNAs (fold change: >2.0; p value:<0.05) considered as potential biomarkers for HBC (AUC: 0.81-0.95). Bioinformatic analysis revealed that these miRNAs shared target genes specially involved in cell proliferation. We also found 8 differentially expressed miRNAs among HBC (BRCA1, BRCA2 and BRCAX), with and expressive deregulation in BRCAX breast tumors. Bioinformatic analysis revealed that these miRNAs shared target genes involved in MAPK, FoxO, and PI3K-Akt signaling pathways. Finally, we established a 4-miRNA panel that distinguished BRCAX from BRCA1/2-associated breast tumors with high accuracy. **CONCLUSIONS:** Our findings indicated that are specifically deregulated miRNAs in HBC.

Furthemore, BRCAX breast tumors displayed distinctive miRNA expression patterns and can be differentiated from BRCA1 and BRCA2 tumors. Once validated in independent and large cohorts, these miRNA expression profiling could have potential value as a complementary clinical diagnostic tool to detect breast cancer patients that could benefit from *BRCA1/2*mutations genetic testing and personalized clinical management.

KEYWORDS: MicroRNAs; Breast Neoplasms; Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome; Biomarcadores; Diagnosis, Differential; Computational Biology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Carcinogênese da mama

A mama é composta por tecido glandular e adiposo sustentado por um estroma fibroso¹. A glândula mamária, por sua vez, é composta por cavidades (alvéolos) que secretam leite unidas por ductos para formar os lóbulos mamários. Células maduras que compõem o epitélio glandular incluem: células luminais, que compõem camada interior da glândula mamária, células mioepiteliais, localizadas na camada externa da glândula, e pequenas populações de células-tronco multipotentes (**Figura 1**)^{1, 2}.



Figura 1 – Glândula mamária e sua população de células. Imagem adaptada de Tordonato e colaboradores².

Grande parte das neoplasias da mama são adenocarcinomas, um tipo de câncer que se origina a partir das células epiteliais que revestem os tecidos glandulares³. A maioria destas lesões se originam a partir do mesmo sítio, mais precisamente no epitélio glandular que reveste o lúmen da unidade ducto lobular terminal (UDLT), a estrutura funcional responsável pela produção do leite materno⁴. Na carcinogênese, células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico a partir de uma série de mutações genéticas sequenciais que ocorrem devido a fatores ambientais, instabilidade e/ou pré-disposição genética, e adquirem uma sucessão de características, denominadas de *hallmarks of cancer* por Hanahan e Weinberg (**Figura 2**)⁵⁻⁶.



Figura 2 – The hallmarks of cancer. Dez características adquiridas necessárias para que células normais se transformem em células cancerosas. Imagem adaptada de Hanahan e Weinberg⁶.

1.1.2 Classificação histológica e molecular

Atualmente, o câncer de mama é amplamente reconhecido como uma doença biologicamente heterogênea uma vez que apresenta elevado grau de diversidade inter e intratumoral. Não obstante, as diferentes características clínicas e prognósticas associadas à progressão e à resistência terapêutica apresentadas pelos tumores mamários têm sido atribuídas a esta heterogeneidade^{7, 8}. Diversos sistemas de categorização têm sido desenvolvidos com a finalidade de organizar e padronizar a classificação destes tumores especialmente para auxiliar na determinação do manejo clínico e terapêutico mais adequado para cada paciente.

Tradicionalmente, os tumores mamários têm sido primariamente classificados de acordo com seu padrão histomorfológico. Dada à elevada diversidade da doença, a classificação atual dos tumores da mama estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) emprega múltiplas categorias⁹. Esta categorização classicamente baseia-se nas características histopatológicas do tumor como principais critérios de classificação, principalmente acerca o tipo histológico e a presença ou ausência de invasão. Enquanto a classificação histológica se atém a padrões morfológicos e organização estrutural do tumor, a

avaliação de invasão se limita à detecção de proliferação anormal das células neoplásicas que penetram através da parede do epitélio mamário para o estroma⁹.

Em relação aos tumores invasivos da mama, os tipos mais comumente observados na prática clínica são o carcinoma invasivo do tipo não-especial (anteriormente definido como carcinoma ductal invasivo), seguido do carcinoma lobular invasivo¹⁰. A determinação do grau histológico, além de ser empregado para avaliação prognóstica, tem auxiliado na discriminação de subtipos histológicos do câncer de mama baseando-se no nível de diferenciação e atividade proliferativa das células tumorais¹¹⁻¹³. A graduação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado por Elston-Ellis, denominado Nottingham, atualmente é o sistema mais recomendado pela OMS e outros órgãos internacionais⁹.

Em termos prognósticos, a classificação histológica do câncer de mama, aliada à análise da sua extensão anatômica proposta pelo sistema de estadiamento TNM, por muitos anos fora a única ferramenta disponível para estratificação de risco do paciente^{14, 15}. Pouco depois, outras características biológicas relevantes foram incluídas na estratificação prognóstica, como o *status* dos receptores esteroides hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e da superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (*human epidermal growth factor receptor-type 2; HER2*). A inclusão da avaliação destes biomarcadores na prática clínica por meio de técnicas de imunohistoquímica foi determinante para o direcionamento do manejo clínico mais adequado para cada paciente, uma vez que este poderia se beneficiar com a hormonioterapia e/ou terapias alvo dependendo da ausência ou presença destes biomarcadores^{16, 17}. No entanto, estes fatores prognósticos baseados em variáveis histopatológicas tradicionais não refletiam, ao menos completamente, a elevada heterogeneidade dos tumores da mama, que possuíam substancial variabilidade no comportamento clínico mesmo entre pacientes com variáveis prognósticas similares¹².

Com a introdução das tecnologias de larga escala, onde centenas de genes e seus produtos são rastreados em um único ensaio, Perou e colaboradores propuseram classificar o câncer de mama em quatro grupos biologicamente e clinicamente distintos baseando-se em perfis de expressão gênica: luminal A; luminal B; HER2 superexpresso (HER2⁺) e tipo basal (*basal-like*)¹⁸. Estes subtipos moleculares correspondiam razoavelmente à caracterização clínica no *status* do RE e de HER2⁺, bem como para marcadores de proliferação e grau histológico^{18, 19}. Poucos anos depois, estudos independentes evidenciaram achados consistentes, inclusive associando cada subtipo com determinado prognóstico e desfecho

clínico (com o subtipo *basal-like* e HER2⁺ sendo apontados como de pior prognóstico), portanto apoiando a noção de que os subtipos moleculares do câncer de mama representavam distintas entidades biológicas^{20, 21}.

1.1.3 Epidemiologia e fatores de risco

Excetuando os tumores de pele não-melanoma, o câncer de mama representa a neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo mundo, constituindo cerca de 25% dos casos novos que foram estimados para 2018²². Nota-se que a taxa de incidência é mais elevada na maioria dos países desenvolvidos, como na América do Norte e no Norte e Oeste Europeu, e mais baixa em algumas regiões da África e Ásia, onde o câncer do colo de útero é mais comumente observado²². No Brasil, a doença também representa o tipo de câncer mais comumente observado entre as mulheres de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA)²³. Segundo os mais recentes dados de estimativa publicados pelo INCA, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama no Brasil para o biênio 2018-19, com risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres²³. Na região Sudeste, o risco é mais elevado quando comparado à média nacional, com valor estimado de 69,50 casos a cada 100 mil mulheres²³. Em estudo recente, da Costa e colaboradores observaram aumento da incidência de câncer de mama invasivo em mulheres residentes do distrito regional de Barretos no período entre 2000 e 2015²⁴, provavelmente devido à implementação e cobertura dos programas de rastreamento realizados pelo Hospital de Amor desde 2003²⁵.

Considerada um método padrão-ouro em diversos países desenvolvidos, a mamografia atualmente é considerada o método disponível mais eficiente para o rastreamento do câncer de mama^{26, 27}. No entanto, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil, a maioria dos casos tem sido diagnosticada tardiamente, e, quando detectadas em estádios precoce, os casos são diagnosticados em ocasiões oportunísticas^{26, 28, 29}. De fato, mais de 60% das mortes por câncer de mama ocorrem em países em desenvolvimento²². No Brasil, mais precisamente, o câncer de mama representa a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, com aumento progressivo das taxas de mortalidade durante as últimas duas décadas^{30, 31}.

A **Tabela 1** apresenta um quadro com os principais fatores de risco do câncer de mama apontados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (com suficiente ou limitada evidência) e por estudos de grande casuística e meta-análises publicados na literatura³². De

modo geral, todos os fatores de risco podem ser divididos em dois grupos: extrínsecos e íntrinsecos. O primeiro grupo geralmente é composto por fatores preveníveis e essencialmente condicionados pelo estilo de vida, dieta ou mesmo intervenção médica de longo prazo, como o uso de contraceptivos hormonais e terapia de reposição hormonal. Em contrapartida, o segundo grupo incluiria características inerentes, tais como idade, sexo, fatores reprodutivos e história familiar de câncer³³.

Risco aumentado (Referência)	Risco reduzido (Referência)
Estilo de vida	Estilo de vida
Consumo de álcool (34–36)	Atividade física (67)
Hábito de fumar <i>(37–39)</i>	Dieta** <i>(68, 69)</i>
Fatores reprodutivos	Fatores reprodutivos
Nuliparidade ou gravidez tardia (40, 41)	Amamentação (41)
Menarca precoce (42, 43)	
Menopausa tardia (42)	
Terapias hormonais	
Uso de anticoncepcionais (44-46)	
Terapia Hormonal de Substituição (47-49)	
Condições médicas e terapias com drogas	
Diabetes (50, 51)	
Dietilestilbestrol (52)	
Digoxina (53–55)	
Fatores ambientais	
Exposição ocupacional (56-59)	
Exposição à radiação ionizante (60–62)	
Doença benigna prévia (63)	
Densidade da mama (64)	
História familiar (65, 66)	

Tabela 1 - Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.

(**) Dieta com alta ingestão de frutas, vegetais e fibras

Dentre os fatores de risco, cabe destacar a importância da história familiar para a incidência do câncer de mama uma vez que envolve uma predisposição genética para a ocorrência de lesões benignas proliferativas ou mesmo tumores malignos na mama^{65, 66}. Estudos epidemiológicos apontam que o risco conferido a um indivíduo por ter parentes com câncer de mama varia de acordo com o grau de parentesco, o número de parentes afetados e a idade ao diagnóstico dos afetados. De fato, mulheres que possuem um parente de primeiro grau com câncer de mama, especialmente diagnosticado antes dos 50 anos de idade, possuem mais que o dobro do risco de desenvolverem a doença quando comparado à população em geral. Além disso, possuir mais de um parente de primeiro grau afetado, ou casos de câncer de mama bilateral na família, também pode conferir maiores riscos ^{65, 70}.

1.1.4 Câncer de mama hereditário

De modo geral, o câncer de mama, bem como as demais neoplasias, pode ser classificado de acordo com a sua origem genética. Embora a maioria dos casos de câncer de mama possua origem esporádica, 15 a 20% dos tumores apresentam algum tipo de relação familiar e apenas 5 a 10% exibem padrões hereditários⁷¹ (**Figura 3**).



Figura 3 – Frequências relativas das formas esporádica, familial e hereditária do câncer. A parcela destacada do gráfico de pizza corresponde aos casos hereditários, que estão essencialmente são associados a uma predisposição genética transmitida pelas gerações de uma mesma família.

Os tumores de origem esporádica estão essencialmente associados com o acúmulo de mutações somáticas adquiridas ao longo da vida de um indivíduo, principalmente causadas por exposição a fatores ambientais e pelo estilo de vida, em genes que são responsáveis por controlar processos biológicos relacionados à carcinogênese. Portanto, tumores esporádicos também estão associados à idade avançada⁷². Além disso, uma vez que estas alterações genéticas ocorrem ao acaso em células somáticas de um tecido específico, elas são somente transmitidas para as células-filhas, e, portanto, não são herdadas pelos descendentes do indivíduo⁷³. Dessa forma, indivíduos afetados pelo câncer esporádico possui história familiar pouco significativa ou mesmo ausente.

O câncer familial é determinado quando a ocorrência de um determinado tipo de câncer em uma mesma família é mais frequente do que o esperado tão somente pelo acaso. No entanto, não é possível determinar um padrão de herança específico, isto é, não é evidente se o risco para o desenvolvimento de câncer é transmitido entre as gerações de uma mesma família. Acredita-se que esta agregação familial de câncer seja provavelmente causada pela combinação de fatores ambientais e genéticos (por exemplo, polimorfismos modificadores de risco)⁷⁴⁻⁷⁶. Por outro lado, importa considerar que é possível que haja situações representadas pela ocorrência casual de tumores esporádicos em uma mesma família, bem como pela presença de uma mutação de baixa penetrância, ou seja, que confere menores riscos para o desenvolvimento de câncer.

Por fim, os tumores hereditários estão associados à presença de uma mutação germinativa em genes de susceptibilidade ao câncer, geralmente genes supressores tumorais. Considerando que, diferente das mutações somáticas, estas alterações genéticas ocorrem em células germinativas, as mesmas podem ser transmitidas para a geração seguinte⁷⁵. Neste contexto, o indivíduo nasce com uma predisposição genética herdada que lhe confere maior risco para o desenvolvimento de tumores em relação à população em geral. Portanto, os tumores hereditários são essencialmente associados a famílias com várias gerações afetadas pela doença, com múltiplos casos de um ou mais tipos de câncer, tumores bilaterais, múltiplos tumores primários e indivíduos que tendem a ter os tumores diagnosticados em idade precoce (<50 anos de idade)^{77, 78}. Tendo em vista estas características, a identificação de indivíduos e famílias sob alto risco de apresentarem uma síndrome de predisposição ao câncer hereditário é de suma importância, pois proporcionaria um impacto direto na prevenção, detecção precoce, manejo clínico e suporte psicológico para os pacientes afetados^{79, 80}. Com intuito de auxiliar esta identificação na prática clínica, toda informação referente à história familiar de câncer e outros registros médicos são levantados para a construção de heredogramas (ou pediarees)⁸¹.

Devido às diversas evidências epidemiológicas de que haveria um forte componente genético envolvido em diversas agregações familiares de câncer de mama, vários estudos de mapeamento genético foram realizados para a identificação de um gene responsável pela susceptibilidade à doença. Finalmente, no início dos anos 1990, estudos baseados em análise de ligação genética (do inglês, *linkage analysis*) demonstraram um sinal de ligação positivo entre o *locus* 17q21 (braço longo do cromossomo 17, na posição 21) e famílias com câncer de mama e/ou ovário hereditários^{82, 83}. O uso do método de clonagem posicional a partir da localização genômica (17q21) proporcionou, subsequentemente, a identificação do gene *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) como candidato a marcador genético causador da síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e de ovário (do inglês, *hereditary breast and ovarian cancer* (HBOC) *syndrome*)⁸⁴. Pouco depois, novas análises de ligação e clonagem

posicional permitiram o mapeamento e identificação do segundo gene associado: *BRCA2* (*Breast <u>Ca</u>ncer 2*), presente no *locus* 13q12 (braço longo do cromossomo 13, na posição 12)^{85, 86}.

Muitos estudos apontavam, inicialmente, que mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* eram responsáveis pela maioria dos casos de câncer de mama hereditário^{87, 88}. Posteriormente, foi demonstrado que estas mutações correspondiam a aproximadamente 30% dos casos, a depender da população avaliada^{71, 89, 90}. De fato, várias variantes raras em outros genes de alta e moderada penetrância foram descritas e associadas ao risco de câncer de mama⁹¹⁻⁹⁴. A maioria destes genes estão envolvidos na manutenção da integridade genômica e têm sido associados a outras síndromes de predisposição ao câncer hereditário, tais como as síndromes de Li-Fraumeni (*TP53*), de Cowden (*PTEN*), e de Peutz-Jeghers (*STK11*). No entanto, estas alterações genéticas responderiam por apenas cerca de 10% dos casos hereditários^{71, 89, 90}. No esforço de identificar novos marcadores genéticos que poderiam explicar a parcela restante, estudos de análise de associação genômica ampla (do inglês, *genome-wide association studies –* GWAS) permitiram a identificação de polimorfismos de base única (do inglês, *single nucleotide polymorphisms –* SNPs) comuns de baixo risco⁹⁵⁻⁹⁷. O efeito acumulativo destes polimorfismos comuns de baixa penetrância, porém, também responderiam por até 15% dos casos de câncer de mama hereditário^{71, 89, 90}.

A Figura 4 apresenta uma representação da distribuição dos casos de câncer de mama hereditário em relação às alterações genéticas em genes de alta, moderada e baixa penetrância. Apesar das pesquisas intensas baseadas em análise de ligação, GWAS, e, mais recentemente, em novas ferramentas de sequenciamento de nova geração (do inglês, *next-generation sequencing* – NGS), a maioria dos casos de câncer de mama hereditário ainda permanece com origem genética desconhecida^{71, 89, 90}. Estes casos também são denominados "BRCAX", termo que se refere a tumores da mama diagnosticados em mulheres com história familiar tipicamente característica da síndrome HBOC, mas que não possui mutações germinativas identificadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e em outros genes de alto risco⁹⁸. Ao final, como alterações genéticas em outros genes de alto risco, tais como nos genes *TP53* e *PTEN*, são bastante raras na população em geral, os genes *BRCA1* e *BRCA2* são os únicos genes de alta penetrância para o câncer de mama que apresentam alterações genéticas com frequências consideráveis para torná-los candidatos prioritários para o teste genético em famílias sob alto risco de apresentarem a síndrome HBOC^{71, 78, 89, 90, 99, 100}.



Figura 4 – Proporção estimada dos casos de câncer de mama hereditário devido a alterações genéticas em genes de alta, moderada e baixa penetrância. Mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* respondem pela maioria dos casos atribuídos a genes de predisposição ao câncer atualmente identificados. Imagem adaptada de Melchor e colaboradores⁷¹.

1.2 Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)

1.2.1 Aspectos clínicos e estimativas de risco

A síndrome HBOC é uma das principais causas para o encaminhamento de indivíduos e famílias a centros de aconselhamento genético e para consideração do teste genético. Com intuito de auxiliar a identificação destas famílias, foram estabelecidos critérios clínicos para o diagnóstico da síndrome, dentre os quais se destacam as diretrizes preconizadas pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (do inglês, *American Society of Clinical Oncology* – ASCO) (**Tabela 2**) e pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (**Tabela 3**).

Tabela 2 – Critérios preconizados pela ASCO para diagnóstico clínico da síndrome HBOC¹⁰¹.

1. 3 ou mais casos de câncer de mama e 1 ou mais casos de câncer de ovário diagnosticados em gualquer idade ou;

2. Mais de 3 casos de câncer de mama diagnosticados antes dos 50 anos de idade ou;

3. Pares de irmãs (ou mãe e filha) com os seguintes tumores diagnosticados antes dos 50 anos de idade:

- a) 2 casos de câncer de mama;
- b) 2 casos de câncer de ovário;
- c) 1 caso de câncer de mama e 1 caso de câncer de ovário.
| 1. Indivíduo de uma família com mutação deletéria conhecida nos genos PPCA1 ou PPCA2: |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Individuo de uma familia com mutação deleteria connecida nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> ; |
| 2. Historia pessoal de cancer de mama (<i>in situ</i> ou invasivo), incluindo um ou mais dos seguintes |
| aspectos: |
| a) ≤45 anos de idade ao diagnóstico; |
| b) ≤50 anos de idade ao diagnóstico, incluindo: |
| – Segundo tumor primário da mama (bilateral ou ipsilateral) ou; |
| – 1 ou mais familiares com câncer de mama em qualquer idade ou; |
| – 1 ou mais familiares com câncer pancreático ou; |
| – 1 ou mais familiares com câncer de próstata de alto grau (Escala de Gleason ≥7) ou |
| metastático. |
| c) ≤60 anos de idade ao diagnóstico, com: |
| – Câncer de mama triplo-negativo. |
| d) Diagnóstico em qualquer idade, incluindo: |
| - 2 ou mais familiares com câncer de mama, câncer de próstata de alto grau (Escala de |
| Gleason ≥7) ou metastático ou câncer pancreático ou; |
| – 1 ou mais familiares com de câncer de mama e ≤50 anos de idade ao diagnóstico ou; |
| – 1 ou mais familiares com de câncer de ovário ou; |
| – 1 familiar do sexo masculino com de câncer de mama ou; |
| Pertencer a uma etnia com alta frequência de mutações (por exemplo, judeus Ashkenazi). |
| 3. História pessoal de câncer de ovário; |
| 4. História pessoal de câncer de mama masculino; |
| 5. História pessoal de câncer de próstata de alto grau (Escala de Gleason ≥7), incluindo: |
| a) 1 ou mais familiares com câncer de ovário ou; |
| b) 1 ou mais familiares com câncer de mama e ≤50 anos de idade ao diagnóstico ou; |
| c) 2 ou mais familiares com câncer de mama, câncer de próstata de alto grau (Escala de |
| Gleason ≥7) ou câncer pancreático; |
| 6. História pessoal de câncer de próstata metastático; |
| 7. História pessoal de câncer pancreático, incluindo: |
| a) 1 ou mais familiares com câncer de ovário ou; |
| b) 1 ou mais familiares com câncer de mama e ≤50 anos de idade ao diagnóstico ou; |
| c) 2 ou mais familiares com câncer de mama, câncer de próstata de alto grau (Escala de |
| Gleason ≥7) ou metástico, ou câncer pancreático; |
| d) Pertencer à etnia de judeus Ashkenazi. |

Tabela 3 - Critérios preconizados pela NCCN para diagnóstico clínico da síndrome HBOC¹⁰².

10

Basicamente, famílias com a síndrome HBOC são caracterizadas pelo risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama em homens e mulheres, câncer de ovário, e, em menor extensão, outros tipos de tumores como câncer de próstata, câncer pancreático e melanoma. Assim como outras síndromes de predisposição ao câncer hereditário, indivíduos afetados tendem a ser diagnosticados em idade precoce, além de uma maior probabilidade de desenvolver tumores bilaterais. Além disso, variantes patogênicas identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* também é um critério importante adotado para o diagnóstico clínico da síndrome HBOC¹⁰³. As estimativas de risco malignidade conferidas por estas mutações variam de acordo com a população estudada, com os métodos aplicados para avaliação e fatores de risco adicionais. A **Tabela 4** apresenta um resumo destas estimativas em indivíduos com variantes patogênicas identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Tabela 4 – Estimativas de risco de malignidade em indivíduos portadores de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Tipo de câncer	Risco na população em geral	Risco de malignidade		
		BRCA1	BRCA2	
Mama	12%	46-87%	38-84%	
Segundo tumor primário da mama	2% dentro de 5 anos	21.1% dentro de 10 anos 83% aos 70 anos	10.8% dentro de 10 anos 83% aos 70 anos	
Ovário	1-2%	37-63%	16.5-27%	
Câncer de mama masculino	0.1%	1.2%	Até 8.9%	
Próstata	6% aos 69 anos	8.6% aos 65 anos	15% aos 65 anos 20% ao longo da vida	
Pâncreas	0.5%	1-3%	2-5%	
Melanoma (cutâneo e ocular)	1.6%	Não se aplica	Risco elevado	

Tabela adaptada do estudo de Petrucelli e colaboradores¹⁰³.

Embora mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* concedam maior risco para o desenvolvimento de câncer de mama e de ovário, diversos estudos apontam que os mesmos possuem penetrância incompleta. A primeira estimativa a partir de coortes de famílias HBOC sugeriram que o risco acumulativo vital (RCV) de desenvolver câncer de mama aos 70 anos de idade era de 87% em mulheres com variantes patogênicas em *BRCA1*¹⁰⁴. Para mulheres com variantes patogênicas em *BRCA1*¹⁰⁴. Estudos

subsequentes reportaram estimativas risco com valores mais baixos, variando entre 46-68% e 38-63% para portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Além disso, evidências de desenvolvimento de um segundo tumor primário da mama, contra ou ipsilateral, também é frequente em famílias HBOC afetadas por mutações em *BRCA1* e *BRCA2*¹¹⁰⁻¹¹². Ao utilizar uma coorte de pacientes com câncer de mama, Metcalfe e colaboradores estimaram um risco aproximado de 21% para o desenvolvimento de um tumor contralateral em 10 anos após o diagnóstico do primeiro tumor primário da mama para mulheres com variantes patogênicas em *BRCA1*, e 11% em *BRCA2*¹¹³. Além disso, Mavaddat e colaboradores estimaram RCVs para desenvolvimento de câncer de mama contralateral aos 70 anos de idade de 83% e 62% para mulheres portadoras de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente¹¹⁴.

O segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres portadoras de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* é, notadamente, o câncer de ovário. Inicialmente, estudos apontavam um RCV de desenvolvimento de câncer de ovários aos 70 anos de idade de 63% em mulheres com variantes patogênicas em *BRCA1*, e 27% em *BRCA2*^{105, 115}. Assim como ocorreu as estimativas de risco para o câncer de mama, foram observadas taxas de riscos menores para o câncer de ovário em estudos posteriores, variando entre 37-59% e 16.5-21% entre mulheres com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente^{108, 109, 114, 116}.

Em relação aos homens portadores de mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*, o risco para o desenvolvimento de câncer de mama também é maior quando comparado ao risco apresentado por homens da população em geral. Interessantemente, o RCV de desenvolver câncer de mama masculino é maior entre portadores de mutações em *BRCA2*, podendo chegar até aproximadamente 9% de risco^{117, 118}. Por sua vez, homens com variantes patogênicas em *BRCA1* apresentam um RCV de 1.2% aos 70 anos de idade¹¹⁷. A mesma tendência é observada em relação ao câncer de próstata. Estudos reportam estimativas maiores de risco para o desenvolvimento câncer de próstata em indivíduos portadores de mutações germinativas em *BRCA2*, que pode chegar até 20% ao longo da vida, quando comparados às taxas apresentadas por portadores de mutações em *BRCA1*, que chega aproximadamente 8.6% de RCV aos 65 anos de idade¹¹⁹⁻¹²¹. Também foi observado que os tumores de próstata de portadores de mutações em *BRCA2* tendem a apresentar alto grau histológico e baixa sobrevida^{122, 123}.

1.2.2 Aspectos patológicos

Certas características patológicas e moleculares são distintas entre tumores da mama esporádicos e tumores da mama associados à síndrome HBOC. Além disso, alguns aspectos também diferem entre tumores associados a variantes patogênicas no gene *BRCA1* e *BRCA2*^{124, 125}.

A prevalência de carcinomas *in situ* é significativamente menor em casos de câncer de mama associados a variantes patogênicas em BRCA1 e BRCA2 em relação aos casos esporádicos^{126, 127}. Embora a maior parte dos portadores de mutações germinativas em *BRCA1* desenvolva carcinomas ductais invasivos do tipo não especial, foi observada maior freguência de tumores com características medulares entre estes pacientes quando comparados aos casos esporádicos e aqueles associados a mutações em BRCA2¹²⁶⁻¹²⁸. Tumores BRCA1 também são caracterizados pelo alto grau histológico, alta taxa mitótica e proliferativa, baixa taxa de diferenciação, e maior grau de pleomorfismo nuclear e de infiltração linfocítica, associações menos observadas em tumores esporádicos e aos associados ao BRCA2^{124, 127-129}. Também tem sido reportado que tumores da mama associados ao BRCA1 tendem a apresentar maior expressão de p53 em relação aos tumores esporádicos, o que possivelmente reflete na maior frequência e diferentes tipos de mutações somáticas em TP53 (Tumor Protein p53) nestes tumores^{130, 131}. Além disso, tumores associados ao *BRCA1* geralmente são classificados como triplo-negativos devido à frequente falta de expressão de RE, PR e HER2^{124, 128, 129}. Estes tumores também apresentam alta expressão de marcadores basais (por exemplo, citoqueratinas (CK) 5/6, CK14, CK17 e EGFR) e baixa expressão de marcadores luminais (CK8/18)¹³²⁻¹³⁴. Interessantemente, alguns tumores da mama esporádicos triplo-negativos têm sido associados à inativação somática do BRCA1, via hipermetilação do promotor do gene ou mesmo através da regulação pós-transcricional de sua expressão, sugerindo que o BRCA1 pode ter um papel fundamental no desenvolvimento de tumores triplo-negativos^{135, 136}.

Ao contrário dos tumores da mama associados a variantes patogênicas em *BRCA1*, tumores *BRCA2* são mais heterogêneos e exibem fenótipos mais similares aos que são apresentados pelos tumores esporádicos^{137, 138}. Contudo, os tumores com mutações germinativas em *BRCA2* tendem a apresentar maior frequência de carcinomas lobulares e maiores índices de formação tubular (isto é, falta de formação de túbulos) em relação aos tumores esporádicos ao *BRCA1*^{127, 128}. Também tem sido demonstrado que, diferente dos tumores *BRCA1*, os tumores da mama associados ao *BRCA2* geralmente

apresentam fenótipo luminal por expressar RE e RP, além de CK8 e CK18^{128, 129, 131}. Em relação aos pacientes determinados como BRCAX, estes geralmente desenvolvem tumores da mama também bastante heterogêneos quanto a características histopatológicas. Os tumores geralmente apresentam grau histológico baixo a intermediário quando comparado aos tumores esporádicos, mas com o perfil imunohistoquímico bastante similar (por exemplo, status de expressão de receptores hormonais equilibrada e distribuição balanceada dos subtipos moleculares)^{139, 140}.

1.2.3 Aspectos moleculares dos genes BRCA1 e BRCA2

1.2.3.1 Estrutura e função biológica

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* possuem estruturas consideravelmente complexas, cada um abrangindo cerca de 80 *kilo bases* (kb) de segmentos do DNA genômico^{141, 142}. O gene *BRCA1* localiza-se no cromossomo 17q21 e é formado por 24 éxons, dentre os quais 22 são regiões que codificam uma grande proteína de 1863 aminoácidos¹⁴¹. Por sua vez, o gene *BRCA2* localiza-se no cromossomo 13q12 e é composto por 27 éxons, dentre os quais 26 codificam uma proteína ainda maior, constituída de 3418 aminoácidos¹⁴².

A proteína BRCA1, que possui 220 kilodaltons (kDa), contém dois domínios que são essenciais para desempenhar a sua função: um domínio RING (*Ring Interesting New Gene*) *finger* amino (N)-terminal e um domínio BRCT (*BRCA1 Carboxi (C)-Terminal*) (**Figura 5A**)¹⁴³. O domínio RING *finger* consiste de zonas de ligação de íons de zinco (Zn2+), que ajudam na mediação de interações entre proteínas, e uma região com atividade de ubiquitina ligase (E3). A atividade é aumentada quando esta região está associada com o domínio RING da proteína BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*) através da heterodimerização¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. O domínio BRCT é constituído por dois elementos dispostos em *tandem* e é responsável pela associação entre o BRCA1 e proteínas fosforiladas envolvidas no reparo de danos de DNA, tais como BRIP1 (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*), CtIP (*C-terminal binding protein 1*) e Abraxas (*BRCA1-A complex subunit Abraxas 1*)^{147, 148}. Além disso, o BRCA1 também possui dois sinais de localização nuclear (do inglês, *Nuclear Localization Signal* – NLS), que facilitam a localização do BRCA1 dentro do núcleo durante a fase de síntese (S) do ciclo celular¹⁴⁹, e um motivo altamente conservado com estrutura de bobinas enroladas (do inglês, *coiled-coil*) que se liga diretamente com PALB2 (*Partner And Localizer of BRCA2*), que, por sua vez, localiza e

se liga à proteína BRCA2¹⁵⁰. Por sua vez, a proteína BRCA2, que possui 384 kDa, também contém dois domínios importantes para desempenhar suas funções: um domínio de ligação ao DNA (do inglês, *DNA-binding domain* – DBD) e um domínio contendo oito repetições BRC (*Breakpoint Cluster Region*) (**Figura 5B**)¹⁴³. O domínio DBD consiste de um domínio helicoidal, três domínios de ligação de oligossacarídeos (do inglês, *oligosaccharides binding* – OB), e um domínio torre (do inglês, Tower – T), que ajudam na estabilização do BRCA2 e sua ligação às fitas simples e duplas de DNA¹⁵¹⁻¹⁵³. Já as repetições BRC têm a propriedade de se ligarem à proteína RAD51, permitindo a formação de complexo chave para o reparo de danos no DNA por recombinação homóloga¹⁵⁴. Além disso, assim como o BRCA1, a proteína BRCA2 também contém duas regiões NLS para mediar sua localização nuclear¹⁵⁵. Por fim, a região N-terminal do BRCA2 interage com o PALB2, que recruta o BRCA2 para o sítio de reparo de danos no DNA¹⁵⁶.





As proteínas BRCA1 e BRCA2 desempenham um papel essencial na manutenção da estabilidade genômica, especialmente através do processo de reparo de danos de dupla-fita do DNA. Ambas as proteínas atuam na regulação da recombinação homóloga, um mecanismo de altamente eficiente que corrige o dano utilizando a informação contida em uma fita homóloga não danificada¹⁵⁷. A **Figura 6** apresenta uma representação esquemática das etapas deste mecanismo, que ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular.



Figura 6 – Mecanismos moleculares envolvidos na recombinação homóloga. Em resposta aos danos de dupla-fita, complexos proteicos formados pelo BRCA1 participam de etapas essenciais para a manutenção da estabilidade genômica. O complexo BRCA1-Abraxas-RAP80 se associa a histonas ubiquitinadas próximas à região danificada através da fosforilação da histona H2AX, e das proteínas MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*) e RNF8 (*RING finger protein 8*). O complexo BRCA1-CtiP se associa ao complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome protein 1*)) para o início da etapa de ressecção das extremidades das fitas danificadas. Por sua vez, o complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 é importante para regular a atividade do RAD51, que auxilia na invasão da fita e consequente síntese de DNA a partir do molde da cromátide irmã. Imagem adaptada de Roy e colaboradores¹⁴³.

Geralmente, quebras de dupla-fita ocorrem devido à exposição de fatores exógenos, majoritariamente por radiação ionizante, e outros compostos genotóxicos¹⁴³. Após o reconhecimento de quebras de dupla-fita por proteínas sensoras, o BRCA1 se liga ao sítio do dano através de sua associação com o complexo proteíco Abraxas-RAP80, que se liga a histonas ubiquitinadas próximas à região danificada¹⁵⁸. Depois, o complexo protéico BRCA1-CtiP promove a ressecção das fitas de DNA danificadas, onde a extremidade das quebras é digerida pela exonuclease CtiP, formando saliências 3' de fitas simples expostas que servirão de substrato para a enzima RAD51¹⁵⁹. A proteína BRCA1 também participa das etapas finais do processo através de sua interação com PALB2, que recruta BRCA2 para a região a ser reparada^{160, 161}. Em seguida, o complexo proteíco BRCA1-PALB2-BRCA2 auxilia o RAD51 a formar filamentos nas fitas simples 3' previamente criadas, permitindo a invasão de uma fita simples de DNA intacta de uma cromátide irmã por uma das fitas danificadas. A fita homóloga atua como molde para início da síntese de DNA e consequente reparo dos danos, restabelecendo a integridade genômica da célula¹⁵⁷.

Além da recombinação homóloga, as proteínas BRCA1 e BRCA2 também interagem e atuam com proteínas envolvidas em diversos processos biológicos, tais como regulação do ciclo celular, regulação da transcrição e ubiquitinação^{162, 163}. Dessa forma, compreende-se que a redução ou falta da atividade funcional destas proteínas pode culminar em uma instabilidade genômica. De fato, estudos experimentais demonstraram que células deficientes para BRCA1 e BRCA2 são mais sensíveis à radiação e apresentam diversas aberrações cromossômicas, possivelmente devido à recombinação homóloga ineficiente¹⁶⁴⁻¹⁶⁹. Além disso, foi reportado que a perda completa de ambos os genes em camundongos é potencialmente letal durante o desenvolvimento embrionário¹⁷⁰⁻¹⁷². Importa mencionar que variantes patogênicas presentes em domínios funcionais contidos nas proteínas BRCA1 e BRCA2 já foram reportadas em famílias com a síndrome HBOC¹⁷³, sugerindo que os genes *BRCA1* e *BRCA2* também desempenham o papel de genes supressores tumorais.

1.2.3.2 Variantes patogênicas

De modo geral, a disfunção do *BRCA1* e do *BRCA2* se origina, majoritariamente, a partir de mutações germinativas que podem estar localizadas por toda a extensão das regiões codificantes dos genes¹⁷³. Uma vez que identificação destas mutações tem impacto direto no manejo clínico dos pacientes, houve um esforço colaborativo internacional para catalogar e avaliar a significância clínica destas variantes genéticas. Dessa forma, a *Breast Cancer Information Core* (BIC) foi estabelecida em 1995 com intuito de fornecer um banco de dados online contendo uma listagem de todas variantes identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (<u>https://research.nhgri.nih.gov/bic/</u>)¹⁷⁴. Embora tenha sido amplamente utilizado por muitos anos, atualmente o BIC não está ativamente curado, de modo que tem sido recomendada a obtenção de informações atualizadas em outros bancos de dados públicos e gratuitos, como por exemplo o ClinVar (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</u>) e o *BRCA Exchange*

(https://brcaexchange.org). O ClinVar é um banco de dados de variantes genéticas em humanos mantido pelo *National Institutes of Health* (NIH), que fornece interpretações de suas respectivas significâncias baseando-se em evidências clínicas^{175, 176}. Por sua vez, o *BRCA Exchange* é um banco mantido em colaboração com o consórcio ENIGMA (*Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles*), e considerado a maior fonte pública de informações sobre variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2*¹⁷⁷.

Até o presente momento, 12.628 mutações distintas em BRCA1 e 13.747 em BRCA2 foram identificadas de acordo com o BRCA Exchange, compreendendo 2.189 e 2.637 variantes de significância clínica e denominadas como "patogênicas", isto é, que confere um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer por produzir proteínas não-funcionais ou mesmo nenhuma proteína. Segundo o ClinVar, os tipos mais comuns de variantes patogênicas são mutações que resultam em proteínas truncadas, como mutações do tipo frameshift (pequenas inserções ou deleções que modificam a matriz de leitura dos aminoácidos, alterando a seguência de códons da proteína) e do tipo *nonsense* (troca de pares de bases que resulta na geração de um stop códon prematuro). Além disso, mutações que afetam os sítios de splicing (alterações que prejudicam o splicing de RNA e resulta na perda completa ou parcial de exons ou na inclusão de íntrons) e grandes rearranjos genômicos também são observados em ambos os genes e podem resultar na tradução de proteínas não-funcionais ^{99,} ¹⁷⁸. Embora menos frequente que as mutações supracitadas, outro tipo de variante genética que pode alterar a função das proteínas BRCA1 e BRCA2 é a mutação do tipo missense, onde a substituição de um par de bases leva à formação de um códon que codifica um aminoácido diferente do original.

Apesar de que várias variantes genéticas tenham sido identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, importa destacar que a prevalência destas mutações pode variar entre etnias e países¹⁷⁹. Enquanto algumas populações apresentam um amplo espectro de variantes genéticas distintas em ambos os genes, outros grupos étnicos podem apresentar mutações específicas com alta frequência devido ao efeito fundador causado pelo isolamento geográfico ou cultural^{179, 180}. Por exemplo, três mutações fundadoras têm sido bem caracterizadas e descritas na população judia Ashkenazi: duas em *BRCA1* (185delAG e 5382insC), e uma em *BRCA2* (6174delT). Estudos estimam que estas mutações estão presentes em cerca de 2,5% (1/40) na população Ashkenazi, enquanto que a taxa na população em geral é de 0,2% (1/500)¹⁷⁹. Além disso, foi reportado que aproximadamente 98% das variantes identificadas

nesta população se tratam destas três mutações fundadoras⁹⁹. Outro exemplo destacado de mutação fundadora é a mutação do tipo *frameshift* 999del5 no gene *BRCA2*, identificada na população geograficamente isolada da Islândia. Estudos estimam que esta mutação está presente em 0.4% (1/250) da população e encontrada em cerca de 8.5 e 7.9% dos tumores da mama e ovário, respectivamente. Ademais, também se estima que a mutação 999del5 ocorre em cerca de 25% dos casos de câncer de mama em mulheres de famílias de alto risco, e em 40% dos casos de câncer de mama masculino^{181, 182}. Diversas outras mutações fundadoras têm sido identificadas em diferentes populações na Europa e em outras partes do mundo¹⁷⁹. Portanto, é evidente que a identificação de mutações fundadoras presentes em famílias de diferentes grupos étnicos é extremamente importante para o aconselhamento genético uma vez que torna possível a utilização de uma abordagem mais específica e rápida para o diagnóstico molecular.

1.2.4 Aconselhamento genético e diagnóstico molecular

Compreende-se que o aconselhamento genético consiste no processo de fornecer a indivíduos e famílias informações esclarecidas sobre a natureza, herança e implicações de distúrbios genéticos, e, consequentemente, auxiliá-los na tomada de decisões médicas e pessoais em relação à doença¹⁸³. Quanto à síndrome HBOC, a colaboração de médicos das áreas de ginecologia, radiologia, patologia e genética humana, bem como de profissionais das áreas de psicologia, enfermagem e biologia molecular, é essencial para: (i) a identificação de famílias sob alto risco; (ii) o cálculo de risco de desenvolvimento de câncer e de *status* mutacional; (iii) fornecer ao indivíduo afetado e aos seus familiares o diagnóstico molecular de variantes patogênicas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e em outros genes conhecidos; (iv) informar indivíduos sobre detecção precoce, quimioprevenção e cirurgias profiláticas; (v) fornecer acompanhamento psicológico aos pacientes; e (vi) fornecer suporte e seguimento clínico¹⁸⁴.

O diagnóstico molecular de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* tem sido disponibilizado em centros especializados em todo o mundo. No entanto, o rastreamento destas variantes genéticas ainda é considerado tecnicamente complexo e requer métodos caros para detecção apropriada. Exceto quando o rastreamento é direcionado à pesquisa por mutações fundadoras, o diagnóstico molecular é laborioso uma vez que ambos os genes não possuem regiões *hotspot* específicas, portanto, as numerosas e possíveis mutações podem ser encontradas por toda a extensão dos genes¹⁸⁵. Desse modo, uma das principais estratégias para identificação destas mutações pontuais é o sequenciamento direto convencional (Sanger) de todos os éxons de ambos os genes e análise comparativa com sequências de referência. Outros métodos alternativos também são empregados, como por exemplo o DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) e o SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), mas ainda estão sujeitos à validação por sequenciamento¹⁸⁵.

Atualmente, a tecnologia de NGS também tem sido empregada e considerada mais vantajosa para o rastreamento de variantes genéticas em *BRCA1* e *BRCA2*, uma vez que permite a análise de um maior número de amostras com menos custo e em menos tempo^{186, 187}. Além disso, caso não sejam identificadas mutações pontuais, outros métodos sensíveis são utilizados para detecção de grandes rearranjos, como o MPLA (*Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*) por exemplo¹⁸⁴. De fato, foi demonstrado que a sensibilidade do teste genética aumenta quanto utilizado uma técnica para identificação de mutações pontuais combinada com uma técnica de detecção de rearranjos¹⁸⁸.

De modo geral, a decisão para a realização do rastreamento de variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* se baseia, principalmente, em informações obtidas a partir da história familiar de um indivíduo. Critérios essenciais incluiriam aquelas já discutidas nas seções **1.1.4** e **1.2.1** deste manuscrito, como: idade ao diagnóstico do câncer, tipo de câncer, grau de parentesco de indivíduos afetados, como também informações sobre indivíduos não afetados e se a família pertence a grupos étnicos de alto risco (por exemplos, judeus Ashkenazi). Somente após uma análise minunciosa destas informações seria possível definir se um determinado indivíduo deve ou não ser encaminhado para a realização do teste genético¹⁸⁴. Além dos benefícios associados ao gerenciamento do risco e tratamento personalizado, a identificação destas mutações pode causar diversas implicações na vida de um indivíduo: desde a definição de estratégias mais agressivas de prevenção (por exemplo, indicação de cirurgias profiláticas e de quimioprevenção) e tratamento a potenciais e diversos efeitos psicossociais¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Portanto, dada as possíveis consequências clínicas e pessoais do resultado do teste genético, é fundamental para um serviço de Aconselhamento Genético realizar uma avaliação de risco acurada de cada indivíduos antes de encaminhá-los para o teste genético.

1.2.5 Avaliação de risco e predição de mutações germinativas

Considerando a complexidade técnica e o alto custo dos métodos de detecção de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o cálculo de risco para o desenvolvimento de câncer e da probabilidade da presença de variantes patogênicas é essencial para a indicação do teste genético. Desta forma, vários modelos de predição têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados para estimar o risco para o câncer e a probabilidade de um indivíduo ser portador de uma mutação germinativa em *BRCA1* e *BRCA2*. Como o conhecimento e o melhor entendimento de vários fatores de risco têm melhorado nas últimas décadas, estes modelos têm sido atualizados para incorporar informações adicionais, como dados histológicos e moleculares, com intuito de aumentar a acurácia das estimativas. Além disso, no esforço de melhorar a sua generalização, os modelos já estabelecidos têm sido testados e modificados de acordo com diversas populações raciais e étnicas, e submetidos à validação em estudos populacionais ou avaliados em estudos comparativos¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Atualmente, os algoritmos mais usados na prática clínica para a avaliação de risco para o câncer de mama são os modelos de Gail e Claus, ambos desenvolvidos a partir de grandes estudos populacionais para estimar o risco de desenvolvimento da doença ao longo da vida. O primeiro modelo de Gail incorporava como critérios a idade, história pessoal reprodutiva, número de biópsias da mama prévias, e o números de parentes de primeiro grau com história pessoal de câncer de mama para determinação de risco em mulheres caucasianas¹⁹⁵. O modelo atualizado, também conhecido como Breast Cancer Risk Assessment Tool (BCRAT), é direcionado para a população em geral, utiliza as mesmas variáveis do modelo original com a adição da presença de hiperplasia atípica em biópsias da mama, e foi criado para aumentar a especificidade da identificação de mulheres sob alto risco de desenvolvimento de câncer de mama invasivo. Contudo, uma das limitações do modelo é a subestimação do risco de câncer hereditário, uma vez que não considera familiares paternos ou parentes de segundo grau diagnosticados com câncer de mama como critérios de avaliação¹⁹⁴. Por outro lado, o modelo de Claus foi originalmente projetado para avaliar a história familiar para estimação do risco, considerando parentes maternos ou paternos de primeiro e segundo grau com história pessoal de câncer de mama, além de suas respectivas idades ao diagnóstico¹⁹⁶. Devido ao foco destinado ao risco hereditário, diferente do modelo de Gail, o modelo de Claus não é acurado para avaliação de risco em mulheres sem história familiar¹⁹⁷.

Indivíduos considerados para realização do rastreamento de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem ser avaliados por meio de diversos modelos que fornecem a probabilidade pré-teste para variantes patogênicas em um destes genes. A **Tabela 5** apresenta um resumo das variáveis incorporadas em seis modelos de predição validados e atualmente utilizados na prática clínica: BRCAPRO, BOADICEA, Myriad (modelo de Frank), Manchester, Penn II e Tyrer-Cuzick.

Tabela 5 – Resumo das variáveis incorporadas em modelos de predição para mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Madala (Dof)	Variáveis de <i>input</i>				
	História familiar	Outros			
BRCAPRO (198)	Status de acometimento do probando; idade ao diagnóstico do probando e de todos os familiares afetados pelo câncer de mama e/ou ovário, próstata e pâncreas; idade atual dos indivíduos não-afetados	Achados histopatológicos (<i>status</i> triplo-negativo e marcadores basais); raça e etnia; cirurgias redutoras de risco			
BOADICEA (199)	Status de acometimento do probando; idade ao diagnóstico do probando e de todos os familiares afetados pelo câncer de mama e/ou ovário, próstata e pâncreas; idade atual dos indivíduos não-afetados	Achados histopatológicos (<i>status</i> triplo-negativo e marcadores basais); ancestralidade Ashkenazi			
Myriad (200)	<i>Status</i> de acometimento do probando; idade ao diagnóstico do probando e de familiares de 1-2º grau com câncer de mama e/ou ovário (< ou >50 anos)	Ancestralidade Ashkenazi			
Penn II (201)	Número de familiares de 1-3º grau com câncer de mama e/ou ovário, próstata e pâncreas; tumores bilaterais	Ancestralidade Ashkenazi			
Manchester (202)	Todos os familiares afetados por câncer de mama, ovário, próstata e pâncreas;	Achados histopatológicos (<i>status</i> triplo-negativo e marcadores basais);			
Tyrer-Cuzick (203)	Idade ao diagnóstico do probando e de familiares de 1-2º grau com câncer de mama e/ou ovário; presença de tumores da mama bilaterais	Fatores reprodutivos; fatores físicos e hormonais; achados histopatológicos (doença benigna ou carcinoma lobular <i>in situ</i>); ancestralidade Ashkenazi;			

Tabela adaptada do estudo de Cintolo-Gonzalez e colaboradores¹⁹³. Ref.: referência.

Embora os modelos de predição de mutações atualmente disponíveis tenham demonstrado resultados satisfatórios por alcançar altas taxas de sensibilidade em famílias típicas da síndrome HBOC, alguns estudos apontam que os mesmos apresentam certas limitações. Primeiro, a maioria dos modelos não consideram a ocorrência de intervenções redutoras de risco (como mastectomias e ooforectomias) na família (Tabela 5), mesmo sendo reportado que estas intervenções alteram a penetrância das variantes genéticas. Por exemplo, estudos reportam que a ooforectomia bilateral reduz significativamente o risco de câncer de mama e de ovário (trompa de Falópio e câncer peritoneal) em portadoras de mutações^{204, 205}. Ou seja, ao ignorar esta variável, o modelo subestima a probabilidade de indivíduos que se submeteram a intervenções profiláticas serem portadores de mutações²⁰⁶. Segundo, por depender, quase exclusivamente, de informações da história familiar de um indivíduo para estimação do risco, os modelos de predição subestimam indivíduos que possuem dados insuficientes ou ausentes de história familiar (por exemplo: pequenas famílias e poucos parentes do sexo feminino)^{207, 208}. Terceiro, ao considerar todos os casos sugestivos de síndrome HBOC como potenciais candidatos à pesquisa por mutações germinativas em BRCA1 e BRCA2, estes modelos terminam apresentando baixas taxas de especificidade. Foi observado em diversos estudos que somente cerca de 25% dos pacientes encaminhados para o teste genético possuem mutações em um dos genes²⁰⁹⁻²¹³. Por fim, os modelos não avaliam probabilidade para mutações germinativas de novo, isto é, uma variante genética presente pela primeira vez em uma família como resultado de uma mutação em uma célula germinativa de um dos pais ou mesmo de uma mutação que ocorreu durante a embriogênese. De fato, tem sido reportado que uma pequena parcela dos tumores ditos como esporádicos são atribuídos a variantes patogênicas em genes de predisposição ao câncer de mama (inclusive em BRCA1 e BRCA2), contudo, estes pacientes são potencialmente subestimados pelos modelos de predição atuais^{214, 215}.

Tendo em vista as limitações supracitadas, compreende-se que ainda há a necessidade de definir critérios adicionais que possam complementar os critérios utilizados pelos modelos de predição atualmente disponíveis a fim de fornecer uma avaliação de risco mais acurada e eficiente. Um dos principais esforços direcionados a melhorar este panorama nos últimos anos tem sido a busca por biomarcadores de diagnóstico capazes de discriminar os tumores de portadores e não-portadores de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Origem e função

Com o advento das tecnologias de seguenciamento genômico em larga escala, o Projeto Genoma Humano pôde enfim fornecer um mapeamento de referência completo das sequências do DNA^{216, 217}. Um dos achados mais relevantes obtidos a partir do sequenciamento completo do genoma humano foi a noção de que as regiões codificantes de proteínas ocupavam menos que 2% do DNA, que contém cerca de três bilhões de nucleotídeos (nts)²¹⁷. Posteriormente novas evidências indicaram que, além da maioria das seguências de genomas eucariotos serem ativamente transcritas em algum ponto durante o desenvolvimento, apenas uma pequena parte destes transcritos são traduzidos em proteínas^{218, 219}. A percepção de que estas sequências não-codificantes supostamente sem papel funcional de fato eram transcritas contrariava a perspectiva original de que os RNAs atuavam quase exclusivamente como molde para síntese de proteínas. Pelo contrário, o transcriptoma humano era composto majoritariamente por RNAs não-codificantes (ncRNAs), que mais tarde mostraram possuir função biológica sobretudo no controle da expressão gênica²²⁰⁻²²³. Dentre estes, os miRNAs compõem a subclasse de pequenos ncRNAs mais frequentemente estudada, especialmente no contexto do desenvolvimento e da carcinogênese^{224, 225}.

A primeira descrição a respeito dos miRNAs foi relatada por Lee e colaboradores (ANO), que identicaram e isolaram um gene do *Caenorhabditis elegans* que não codificava um RNAm, e sim um RNA não-codificante de proteína que continha sequências parcialmente complementares a frações da região 3' UTR (untranslated region) dos RNAm lin-4 e lin-28^{226, 227}. Dessa forma, foi sugerido que a tradução destes RNAm era regulada pelo lin-4 através de uma interação *sense-antisense* entre as moléculas^{226, 227}. Logo depois, este mecanismo molecular foi validado por Wightman et al., que evidenciaram múltiplas sequências da região 3' UTR do RNAm lin-4 que seriam complementares ao lin-4^{226, 228}. Dessa forma, a interação do lin-4 com os pares de base (pb) complementares da região 3' UTR do RNAm alvo propiciou a inibição da tradução da proteína lin-4 a nível pós-transcricional^{226, 228}.

Similar ao mecanismo de regulação promovido pelo lin-4, o let-7 também foi descrito em *C. elegans* como um pequeno fragmento de RNA capaz de inibir a expressão do *LIN-41*^{226,}

²²⁹. Mais tarde foi observado que o let-7 era conservado também em outros organismos, inclusive em humanos^{226, 252}. Até aquele momento acreditava-se que o lin-4 e o let-7 representavam uma classe de pequenos RNAs temporais (*small temporal* RNAs; stRNAs) que regulavam especificamente o tempo de desenvolvimento dos animais^{226, 230}. No entanto, novas moléculas de RNAs semelhantes aos stRNAs foram evidenciados em 2001, onde, por sua vez, desempenhavam diferentes papeis funcionais em diversos processos celulares^{226, 231, 232}. Dessa forma, o termo "microRNA" foi, enfim, empregado para denominar esta nova classe de pequenas moléculas de RNA regulatórias^{226, 231-233}.

1.3.2 Biogênese e mecanismos de regulação

Os miRNAs constituem uma grande família de pequenos RNAs não-codificantes (18-25 nts) que contribuem para a regulação pós-transcricional dos níveis proteicos das células²²⁶. Genes que codificam estas moléculas são amplamente identificados em quase todos os cromossomos, exceto no cromossomo sexual Y²²⁶. Dados mais recentes do miRbase, banco de dados que fornece dados integrados das sequências e alvos preditos dos miRNAs, apontam que já foram caracterizadas 2.654 sequências maduras de miRNAs transcritos a partir do genoma humano²³⁴.

A Figura 7 mostra uma representação esquemática da organização genômica dos miRNAs. Os genes de miRNAs se encontram distribuídos de forma sequencial, ou em *clusters* (do inglês, agrupamentos), inclusive podendo estar sob comando de um único promotor²²⁶. De qualquer forma, baseado em sua organização genômica, os miRNAs podem ser classificados em intergênicos ou intragênicos. Os miRNAs intergênicos são transcritos a partir de genes autônomos, ou seja, que possuem regiões regulatórias específicas e que se localizam entre dois outros genes independentes conhecidos^{226, 235}. Os miRNAs intragênicos podem ser subdivididos em intrônicos e exônicos. Os intrônicos estão localizados nos íntrons, possuindo ou não seus próprios promotores²³⁵. Por sua vez, os miRNAs exônicos se encontram sobrepostos à porção final de éxon e início de um íntron subsequente de um gene não-codificante, não possuindo, portanto, promotores específicos²³⁵.





Grande parte dos genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, resultando na produção de longos transcritos primários denominados pri-miRNAs. Estes produtos transcritos são caracterizados por uma estrutura secundária constituída por um a vários miRNAs em forma de grampo (*hairpin*), cada um constituído por um tronco de fita dupla contendo aproximadamente 33 nts, um *loop* conectando as duas fitas que compõe o tronco e sequências flanqueadoras de fita única que, assim como os RNAm, contém um *cap* de 7 metil guanosina (7MG) na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada (poli-A) na extremidade 3'^{226, 236}. Em humanos, pri-miRNAs são ainda processados no núcleo da célula por um complexo proteico, denominado "Microprocessador", formado principalmente pela ribonuclease (RNase) III Drosha associada ao seu cofator DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*)^{226, 237}. Este cofator, que reconhece RNAs de fita dupla, permite a ligação do Complexo Microprocessador à junção entre as sequências flanqueadoras e o *loop* do pri-miRNA,

promovendo a clivagem pri-miRNA pela Drosha e consequente liberação de um *hairpin* encurtado denominado miRNA precursor (pre-miRNA)^{226, 238, 239}. A clivagem promovida pela Drosha é assimétrica devido a presença de dois domínios RNAse III na enzima, produzindo um pre-miRNA com duas bases não-complementares na extremidade 3' e um grupo fosfato na extremidade 5'²²⁶. Além da via canônica, diversos pre-miRNAs também são produzidos por outra via alternativa associada ao mecanismo de *splicing* dos RNAm, denominada via mirtron^{226, 240, 241}. Mirtrons são pequenos íntrons que possuem o potencial de formação de *hairpins* de pre-miRNAs, independente da ação da enzima Drosha, através da complementariedade entre as bases das sequências dos domínios 5' e 3' destes *introns*^{226, 240-243}. Embora não seja um mecanismo clássico e conservado, a via mirtron já foi evidenciada em mamíferos, tais como primatas e roedores²⁴⁰.

Após a formação do pre-miRNA no núcleo da célula ocorre a exportação desta molécula para o citoplasma geralmente através da exportina-5 (Exp-5)^{226, 244}. Ainda no núcleo da célula, a Exp-5 se liga à proteína RAN (*ras related nuclear*) associada a uma molécula de trifosfato de guanosina (*guanosine triphosphate*; GTP) e ao pre-miRNA, formando um complexo que interage com as nucleoporinas. Esta interação permite a exportação do pre-miRNA do núcleo para o citoplasma pelos poros nucleares^{226, 245, 246}. O complexo Exp-5/RAN-GTP/pre-miRNA então é desfeito através da hidrólise da molécula de GTP associada à RNA em difosfato de guanosina (GDP) pela enzima RAN-GAP (*GTPase activating protein*), permitindo a liberação completa do pre-miRNA²²⁶. Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA dependente de Dicer ocorre através dos reconhecimentos da porção contendo as duas bases não-complementares da extremidade 3' do pre-miRNA pelo domínio PAZ (Piwi/Argonauta/Zwille) e da estrutura dupla-fita do tronco do pre-miRNA pelo domínio RNAse do Dicer e consequente clivagem do pre-miRNA pelo domínio RNAse do Dicer e consequente clivagem do pre-miRNA em um duplex de miRNA maduro (miRNA/miRNA*)^{226, 247, 248}.

A formação do complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex*; RISC) corresponde à última etapa da biogênese dos miRNAs. Após a produção do duplex de miRNA, a Dicer é recrutada juntamente com a proteína AGO2 (*Argonaute 2*) pela TRBP (*TAR RNA binding protein*) para formarem o complexo de carregamento da RISC, denominado RLC (*RISC loading complex*)^{226, 249}. Neste complexo de carregamento ocorre a

transferência do duplex miRNA/miRNA* para a AGO2, formando assim a miRISC (*miRNA-induced silencing complex*). Há quatro tipos de proteínas argonautas em humanos que podem carregar miRNAs, mas apenas a AGO2 possui propriedade catalítica para clivagem de miRNAs^{226, 250, 251}. Dessa forma, na miRISC ocorre a separação das fitas do duplex miRNA/miRNA*, sendo apenas a fita com a região 5' menos estável selecionada²²⁶. Esta fita, denominada fita guia e propriamente o miRNA ativo, direciona a miRISC ao RNAm alvo, onde irá atuar na regulação da expressão gênica²²⁶. A **Figura 8** mostra uma representação esquemática do processo de biogênese dos miRNAs descrito nesta subseção.



Figura 8 – Biogênese dos microRNAs. A biogênese de miRNAs maduros consiste em um processo complexo que envolve diversas etapas sequenciais de processamento, que ocorre desde o núcleo até o citoplasma das células. Imagem adaptada de Ding e colaboradores²⁵².

Classicamente, o papel funcional dos miRNAs é identificar RNAm alvos com intuito de impedir a síntese de proteínas através de diversos mecanismos^{253, 254}. A regulação póstranscricional da expressão gênica é iniciada pela interação e pelo pareamento da região *seed* do miRNA, pequena sequência de 6-8 nts localizada em sua extremidade 5', com as bases contidas principalmente na região 3' UTR do RNAm^{255, 256}. Além de possuírem pequenas sequências *seed*, os miRNAs atuam sem a necessidade de pareamento completo com o seu alvo. Esta peculiaridade enfatiza o potencial regulatório destas pequenas moléculas uma vez que um único miRNA pode ser capaz de regular a expressão de vários RNAm alvos, bem como pode cooperar com outros miRNAs na regulação de um único alvo, influenciando, portanto, a sinalização de múltiplas vias²⁵⁷⁻²⁵⁹.

Estudos recentes têm concedido uma nova perspectiva sobre a complexidade da regulação pós-transcricional mediada pelos miRNAs^{253, 254}. Por exemplo, o grau de complementariedade entre o miRNA e o RNAm alvo já foi considerado um parâmetro definitivo para determinar o mecanismo de ação da miRISC, sendo o pareamento completo associado com a degradação do RNAm e o pareamento incompleto associado com a inibição do processo tradução²³⁶. No entanto, já foi evidenciado que interações parcialmente complementares também podem resultar na clivagem do transcrito alvo^{254, 260}. Além disso, novos mecanismos regulatórios além da inibição da tradução e desestabilização do transcrito alvo têm sido descritos. Neste sentido, embora o papel canônico dos miRNAs envolva a regulação negativa da expressão gênica, alguns estudos demonstraram que estas moléculas também podem mediar o aumento da expressão de proteínas e transcritos^{254, 261-263}. Por exemplo, Ørom, Nielsen e Lund (2008) demonstraram que o miR-10a, além de suprimir a expressão de outros genes, interagia com a 5' UTR de RNAm de proteínas ribossomais para aumentar a eficiência da tradução²⁶². Outro mecanismo inusitado foi evidenciado por Place e colaboradores (2008), onde o miR-373 induziam a expressão de E-caderina e CSDC2 (coldshock domain-containing protein C2) in vitro ao interagir com sítios específicos presentes nas regiões promotoras dos genes²⁶⁴. Mais recentemente, Zhang e colaboradores (2014) forneceram evidência adicional ao demonstrar que o let-7i e outros miRNAs presentes no núcleo das células induziam a promoção de transcrição ao interagirem com os motivos TATA-BOX, sequências encontradas nas regiões promotoras dos genes em eucariotos²⁶³.

Ao final, estima-se que mais de 60% dos genes codificantes de proteínas possam ser regulados pelos miRNAs em mamíferos^{226, 265}. Apesar dos mecanismos envolvidos nesta regulação ainda estejam sendo esclarecidos, evidências apontam que os miRNAs estão envolvidos em diversos processos biológicos essenciais, tais como o desenvolvimento, diferenciação, proliferação e apoptose²²⁶. Uma vez que estes processos estão muitas vezes desregulados em tumores, acredita-se que a desregulação da expressão dos miRNAs possa contribuir para o processo de carcinogênese²²⁶.

1.3.3 Desregulação da expressão de microRNAs no câncer

Tendo em vista as propriedades regulatórias dos miRNAs, compreende-se que a expressão aberrante destas pequenas moléculas implica em consequências biológicas substanciais, inclusive contribuindo para o desenvolvimento e progressão de diversas patologias humanas, inclusive o câncer²⁶⁶⁻²⁶⁸.

A desregulação da expressão de miRNAs em células tumorais se deve principalmente ao fato de que grande parte dos miRNAs estão localizados em sítios frágeis do genoma humano, que são regiões cromossômicas instáveis que são mais susceptíveis a alterações genômicas e estão frequentemente alterados em diversos tipos de tumores²⁶⁹. Outros fatores também estão envolvidos nesta desregulação, como alterações epigenéticas, a ativação ou inibição de fatores de transcrição e defeitos na maquinaria da biogênese dos miRNAs²⁷⁰⁻²⁷⁷. No entanto, o primeiro indício de envolvimento de miRNAs no câncer humano foi demonstrado por Calin e colaboradores (2002), que constataram que o miR-15a e o miR-16 eram codificados a partir de uma região cromossômica (13q14) frequentemente deletada na leucemia linfocítica crônica (LLC)²⁷⁸. Mais tarde, outros trabalhos confirmaram o envolvimento destes miRNAs na patogênese da doença in vitro e in vivo²⁷⁹⁻²⁸¹. Deste então grande acúmulo de evidências sustentam a hipótese de que a desregulação da expressão de miRNAs favorece a carcinogênese ao modular a expressão de alvos que controlam processos associados com crescimento celular, diferenciação, motilidade, angiogênese e apoptose^{226, 259, 266, 282-284}. Neste sentido, os miRNAs desempenham dois papeis funcionais: um papel com atividade oncogênica, regulando negativamente a expressão de genes supressores tumorais; bem o papel de atuar como supressores tumorais ao regular negativamente a expressão de oncogenes²⁸⁵⁻²⁸⁶.

1.3.4 MicroRNAs como biomarcadores no câncer de mama

Devido ao melhor entendimento da biologia tumoral e à introdução de novas tecnologias moleculares que ocorreram nas últimas décadas, a pesquisa de biomarcadores potenciais para utilização na prática clínica tem sido bastante documentada²⁸⁷. Neste contexto, a identificação de perfis específicos de expressão gênica tem sido uma das abordagens estudadas para o diagnóstico precoce e diferencial de tumores, determinação prognóstica e mesmo para predição de resposta terapêutica^{19, 288}. No entanto, estudos de expressão gênica geralmente são limitados uma vez que requerem a utilização de tecidos frescos ou congelados para obtenção de RNAm íntegros. Embora blocos de tecidos embebidos em formalina e fixados em formalina (*fixed-formalin, embebbed paraffin* – FFPE) sejam mais acessíveis especialmente para estudos retrospectivos, a sua utilização não é recomendada dado à extensiva degradação dos RNAm²⁸⁹. Levando em consideração os achados na literatura apontando a intrínseca associação dos miRNAs com a regulação pós-transcricional da expressão gênica, a expressão desregulada destas pequenas moléculas também tem sido avaliada no contexto da carcinogênese. Estudos que investigaram o perfil de expressão de miRNAs em uma ampla gama de tumores humanos constataram que os tecidos, de fato, possuem padrões de expressão de miRNAs característicos, denominados "assinaturas" 290-292. Dessa forma, surgiu a hipótese de que estas assinaturas moleculares específicas poderiam ser utilizadas para fins diagnósticos²⁹³. Graças ao rápido advento de tecnologias que permitiram a detecção sensível e específica de miRNAs em vários tipos de amostras biológicas, os miRNAs têm sido apontados como potenciais biomarcadores em diversos tipos de tumores²⁹⁴.

O primeiro estudo a evidenciar assinaturas de expressão de miRNAs no câncer de mama foi conduzido por lorio e colaboradores em 2005, onde observaram 29 miRNAs diferencialmente expressos entre 76 tecidos tumorais e 10 tecidos normais da mama utilizando a tecnologia dos *microarrays* (do inglês, microarranjos). Dentre estes miRNAs desregulados, os autores destacaram que as expressões do *miR-10b*, do *miR-125b* e do *miR-145* estavam suprimidas nos tumores, enquanto o *miR-21* e o *miR-155* estavam superexpressos²⁹⁵. Posteriormente, Volinia e colaboradores (2006) determinaram um perfil de expressão de miRNAs para seis tipos de tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, em uma casuística de 540 amostras²⁹⁶. Em estudo mais recente, Cuk e colaboradores propuseram 4 miRNAs candidatos à detecção precoce do câncer de mama ao evidenciar sua desregulação em plasma de pacientes com tumores de baixo estádio clínico quando comparado ao padrão de expressão apresentado no plasma de pacientes saudáveis²⁹⁷. Ao final, diversos estudos investigaram o papel dos miRNAs no diagnóstico do câncer de mama utilizando amplo espectro de amostras biológicas, inclusive minimamente invasivas²⁹⁸⁻³⁰⁰. Embora possam haver algumas inconsistências nos achados destes estudos, especialmente devido à aplicação de diferentes plataformas de detecção e ferramentas de análise, a expressão de alguns miRNAs em tumores da mama foram validados na maioria dos estudos, como a superexpressão do *miR-155* e baixa expressão do *miR-145* quando comparado aos controles, por exemplo^{301, 302}.

Considerando a elevada heterogeneidade do câncer de mama, alguns estudos também visaram associar assinaturas de expressão de miRNAs com características histopatológicas dos tumores. Por exemplo, Volinia e colaboradores determinaram uma assinatura para invasividade ao identificar 9 miRNAs diferencialmente expressos durante a transição de CDIS para CDI utilizando tecnologia de sequenciamento de pequenos RNAs³⁰³. Adicionalmente, Giricz e colaboradores evidenciaram a expressão desregulada de 6 miRNAs durante a progressão do CLIS para CLI³⁰⁴. Seguindo outra abordagem, Mattie e colaboradores evidenciaram miRNAs específicos que distinguiam status do RE e do HER2 em biópsias de tumores da mama³⁰⁵. Poucos anos mais tarde, Lowery e colaboradores identificaram assinaturas de expressão de miRNAs que prediziam o status do RE, do RP e do HER2 com elevada acurácia³⁰⁶. Não obstante, Blenkiron e colaboradores conduziram o primeiro estudo que identificou uma assinatura de expressão contendo 31 miRNAs capaz de discriminar os subtipos moleculares do câncer de mama³⁰⁷. Em breve meta-análise, van Schooneveld e colaboradores evidenciaram anos mais tarde achados com substancial consistência em estudos posteriores³⁰⁸⁻³¹⁰. Em termos prognósticos, a identificação de assinaturas de expressão de miRNAs capazes de classificar os tumores da mama de acordo com características patológicas também poderia auxiliar na determinação de risco de progressão e direcionar estratégias terapêuticas. Neste contexto, grande acervo na literatura tem apontado o papel prognóstico e preditivo de resposta terapêutica dos miRNAs no câncer de mama^{294, 310-312}.

Dentre os diversos candidatos a marcadores moleculares, não apenas para o câncer de mama, mas para diversos tipos de tumores, os miRNAs têm sido considerados uma alternativa

vantajosa especialmente devido ao fato de serem moléculas altamente estáveis e resistentes à degradação, podendo ser detectados em diferentes tipos de amostras biológicas, como sangue, urina e em tecidos FFPE, cuja disponibilidade é abundante em bancos de arquivos de instituições de pesquisa biomédica²⁹⁸⁻³⁰⁰. No entanto, mesmo diante dos resultados promissores acerca o papel dos miRNAs como biomarcadores no câncer de mama esporádico, ainda há poucos estudos que investigaram esta aplicabilidade no câncer de mama hereditário até o presente momento.

Diversos estudos reportaram que tumores da mama hereditários apresentam diferentes perfis de expressão gênica comparado aos tumores esporádicos³¹³⁻³¹⁶. Em estudo conduzido no Brasil, Carraro e colaboradores investigaram o perfil genômico e transcricional de pacientes jovens com câncer de mama e evidenciaram genes diferencialmente expressos entre tumores positivos e negativos para mutações em BRCA1 e BRCA2, sugerindo processos biológicos distintos envolvidos no desenvolvimento destes tumores em relação aos casos de câncer de mama não-mutados³¹⁶. Portanto, uma vez que a desregulação da expressão gênica em tumores hereditários associado aos genes BRCA1 e BRCA2 tem sido relatada na literatura, sugere-se que mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica também possam estar prejudicados e/ou desregulados. Uma das hipóteses é que isso também se deva à expressão aberrante de miRNAs. De fato, Tanic e colaboradores identificaram diferentes perfis de expressão de miRNAs entre tumores hereditários (BRCA1, BRCA2 e BRCAX) e tecidos normais da mama de mulheres saudáveis portadoras e não-portadoras de variantes patogênicas em BRCA1 ou BRCA2. Parte dos miRNAs diferencialmente expressos foram considerados específicos para o câncer de mama hereditário, isto é, que não foram evidenciados ou reportados na literatura em tumores esporádicos³¹⁷. Anos mais tarde, Vos e colaboradores demonstraram que tumores da mama apresentam desregulação massiva da expressão de miRNAs em relação aos tecidos normais em portadoras de variantes patogênicas em BRCA1 e BRCA2. Interessantemente, tecidos normais de portadoras de mutações em BRCA1 também apresentaram alterações na expressão de miRNAs quando comparados aos tecidos normais de não-portadoras³¹⁸.

Com intuito de avaliar o papel dos miRNAs como biomarcadores no câncer de mama hereditário, Estal e colaboradores observaram perfis distintos de expressão de miRNAs entre quatro grupos de câncer: tumores de mama hereditários associados ao *BRCA1*, *BRCA2* ou

BRCAX e tumores da mama esporádicos³¹⁹. No entanto, os autores somente puderam validar, com acurácia limitada (70,1%), potenciais biomarcadores para discriminar tumores mutados (*BRCA1/2*) e não-mutados (BRCAX e tumores esporádicos)³¹⁹. Resultados mais consistentes foram obtidos no ano seguinte por Tanic e colaboradores, onde foram evidenciadas assinaturas de expressão de miRNAs preditivas de mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* em amostras de tecido tumoral parafinado com 92% de acurácia³²⁰. No entanto, principalmente devido à escassez de estudos, ainda não há consenso quanto ao papel dos miRNAs como biomarcadores no câncer de mama hereditário.

Dadas às evidências obtidas no câncer de mama esporádico, acredita-se que os miRNAs poderiam se inserir como biomarcadores de mutações em tumores hereditários. Adicionalmente, considerando o potencial destas moléculas na regulação de diversos processos biológicos, a hipótese é de que o câncer de mama hereditário apresenta assinaturas específicas de expressão de miRNAs uma vez que o mesmo possui características clínicas e patológicas distintas dos tumores esporádicos. A identificação destes miRNAs forneceria melhor entendimento da carcinogênese do câncer de mama hereditário, inclusive abrindo espaço para o estudo de novos alvos terapêuticos.

2 JUSTIFICATIVA

Compreende-se que os tumores da mama de portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* apresentam distintas características fenotípicas e perfis de expressão gênica em relação aos tumores não-mutados. Nesse sentido, tem sido sugerido que estas diferenças biológicas podem também ser influenciadas por alterações genômicas e epigenéticas que afetam os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica. Levando em consideração que os miRNAs contribuem para a regulação da expressão gênica, e que vários estudos têm identificado diferentes padrões de expressão em tumores humanos, existe a hipótese que tumores hereditários associados a variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* podem apresentar níveis de expressão alterados de miRNAs. Contudo, ainda há poucos estudos que investigaram o perfil de expressão de miRNAs em tumores hereditários associados à síndrome HBOC.

Tendo em vista que os miRNAs têm sido apontados como potenciais biomarcadores no câncer de mama esporádico, é possível que existam determinados miRNAs que apresentam níveis de expressão diferenciados em tumores de mama hereditários e que podem estar associados a presença ou ausência de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. Portanto, a análise de expressão de miRNAs poderia ser utilizado para o propósito de classificação dos tumores hereditários, bem como para expandir o entendimento da biologia destes tumores.

Esta tese foi proposta com intuito de caracterizar perfis de expressão de miRNAs de tumores da mama de mulheres brasileiras com história familiar sugestiva de síndrome HBOC e determinar potenciais biomarcadores capazes de classificar de forma acurada estes tumores hereditários. Uma vez identificados, estes biomarcadores ser utilizados para complementar os critérios atuais de seleção de pacientes que poderiam se beneficiar do teste genético para rastreamento de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar perfis de expressão do câncer de mama hereditário associados a variantes patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 e avaliar o papel dos miRNAs diferencialmente expressos como potenciais biomarcadores.

3.2 Objetivos específicos

 Identificar e comparar os perfis de expressão diferencial de miRNAs em tumores da mama BRCA1, BRCA2 e BRCAX hereditários por meio do ensaio nCounter da NanoString e utilizando amostras FFPE;

 Avaliar a performance diagnóstica dos miRNAs evidenciados como diferencialmente expressos em discriminar tumores hereditários da mama;

Identificar genes alvos putativos e vias biológicas reguladas por estes microRNAs que estejam associados ao processo de carcinogênese da mama através de análise bioinformática.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo envolvendo uma <u>fase de</u> <u>exploratória</u> para o rastreamento de microRNAs diferencialmente expressos em tumores da mama de pacientes portadores e não portadores de mutações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* a partir de amostras FFPE; e uma <u>fase *in silico*</u> para predição de genes alvos e vias biológicas potencialmente regulados por estes miRNAs. A **Figura 9** apresenta um fluxograma sumarizando as etapas desenvolvidas durante o projeto.



Figura 9 – Delineamento experimental. Todas as atividades estão descritas em detalhes nas próximas subseções da Metodologia. WT: *wild-type*.

4.2. População de estudo

4.2.1 Descrição da casuística e critérios de elegibilidade

A população de estudo foi composta por uma amostragem de conveniência compreendendo o total de 74 pacientes do sexo feminino, maiores de 18 anos de idade, não-relacionadas e admitidas no Hospital de Amor entre 2003 e 2017. Esta casuística consistiu de 66 pacientes que foram diagnosticadas com câncer de mama d e 8 pacientes saudáveis, isto é, que não apresentavam história pessoal de câncer. Os casos selecionados foram classificados da seguinte forma:

 15 pacientes com história pessoal de câncer de mama e história familiar positiva de câncer de mama e/ou ovário, portadoras de mutações germinativas patogênicas confirmadas em BRCA1;

 14 pacientes com história pessoal de câncer de mama e história familiar positiva de câncer de mama e/ou ovário, portadoras de mutações germinativas patogênicas confirmadas em BRCA2;

 14 pacientes com história pessoal de câncer de mama e história familiar positiva de câncer de mama e/ou ovário, não-portadoras de mutações germinativas patogênicas confirmadas em BRCA1, BRCA2 ou em outros genes de alto risco conhecidos (TP53 e PTEN);

 23 pacientes com história pessoal positiva de câncer de mama e história familiar <u>negativa</u> de câncer de mama e/ou ovário;

 5 pacientes saudáveis com história familiar positiva de câncer de mama e/ou ovário, portadoras de mutações germinativas patogênicas confirmadas em BRCA1 (n = 3) ou BRCA2 (n = 2) e que foram submetidas à mastectomia profilática;

 3 pacientes saudáveis com história familiar <u>negativa</u> de câncer de mama e/ou ovário e que foram submetidas à biópsia cirúrgica ou de fragmento de agulha da mama após receber resultados suspeitos de malignidade ao exame da mamografia (BI-RADS[®] 4).

O levantamento dos casos de câncer de mama hereditário associados a variantes patogênicas em BRCA1 e BRCA2 foi realizado a partir da casuística de 51 pacientes utilizada na dissertação de Mestrado da aluna Gabriela Carvalho Fernandes, que desenvolveu um estudo de caracterização clinicopatológica dos tumores da mama hereditários³²¹. Quanto ao levantamento dos casos de câncer de mama hereditário sem mutacões identificadas em BRCA1, BRCA2 e em outros genes de alto risco (portanto designados como BRCAX), foi realizado a partir de um banco de dados gentilmente cedido pela Dra. Edenir Inêz Palmero, responsável pelo setor de Oncogenética do Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Amor e colaboradora do projeto. A Figura 10 apresenta o fluxograma de seleção das pacientes com câncer hereditário. Todas as pacientes pertencentes a famílias de alto risco para a síndrome HBOC e incluídas no presente estudo foram encaminhadas para o teste genético pelo Departamento de Oncogenética do Hospital de Amor após preencherem critérios clínicos para história pessoal e/ou familiar de HBOC definidos pela NCCN¹⁰². As variantes patogênicas foram rastreadas através do sequenciamento gênico e/ou por MPLA no Centro de Diagnóstico Molecular da mesma instituição. Todas as informações relacionadas ao aconselhamento, teste genético e manejo das famílias sob alto risco de câncer hereditário no Hospital de Amor estão descritas em detalhes em um artigo redigido pelos membros do Departamento de Oncogenética³²².



Figura 10 – Fluxograma do processo de seleção de pacientes com câncer hereditário.

A seleção dos 23 casos de câncer de mama esporádico foi feita de forma sorteada a partir de uma extensa lista, fornecida pelo Departamento de Registro Hospitalar de Câncer, de pacientes do sexo feminino com câncer de mama invasivo (n = 4184), que foram atendidas e tratadas no Hospital de Amor entre 2009 e 2015. Na ocasião do diagnóstico, estas pacientes

não foram encaminhadas ao Departamento de Oncogenética por não apresentarem aspectos clínicos sugestivos de síndrome de predisposição genética ao câncer. Portanto, elas não foram elegíveis para a realização do teste genético para pesquisa de variantes em *BRCA1* e *BRCA2*. A fim de garantir que estas pacientes possuíam baixo ou nenhum risco para mutações em ambos os genes, foram incluídas apenas aquelas que obtiveram scores <10% de acordo com os sistemas de predição Manchester, Myriad e Penn II^{201, 202, 323}.

As cinco pacientes saudáveis portadoras de mutações germinativas e patogênicas em *BRCA1* ou *BRCA2* foram selecionadas de forma aleatória a partir de uma lista de pacientes submetidas à mastectomia profilática entre 2012 e 2014, fornecida pelo Departamento de Mastologia e Reconstrução Mamária do Hospital de Amor. Estas pacientes haviam sido encaminhadas ao Departamento de Oncogenética após uma variante germinativa patogênica ter sido identificada em suas respectivas famílias e, portanto, foram convidadas a realizarem o teste genético preditivo para a mutação determinada. Quanto às três pacientes saudáveis sem história familiar sugestiva de síndrome de predisposição ao câncer hereditário, as mesmas foram selecionadas de forma aleatória a partir de listas de agendamento para biópsias cirúrgicas, fornecidas pelo Centro Cirúrgico de Pequenas Cirurgias do Hospital de Amor. Com o propósito de assegurar que estes casos fossem constituídos por mulheres com baixo risco para o desenvolvimento de câncer de mama, foram somente incluídas pacientes com *scores* de risco inferiores a 1.66% de acordo com o modelo de Gail e cujas biópsias não apresentaram lesões proliferativas e/ou atípicas.

Para o propósito do estudo, foram excluídos aqueles que apresentaram: (i) ausência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ou quando o mesmo não estava devidamente datado e assinado; (ii) dados que indicavam tratamento prévio em outra instituição; (iii) ausência de dados associados ao diagnóstico, tratamento e/ou seguimento das pacientes; (iv) ausência de material parafinado suficiente para posterior análise molecular; (v) má qualidade do material obtido pós-extração do RNA total.

4.2.2 Coleta de dados clínicos e patológicos

Após a seleção dos casos e a distribuição das pacientes de acordo com grupos amostrais determinados, foram solicitados os respectivos prontuários médicos das pacientes junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital de Amor para coleta de dados clínicos e patológicos. A revisão dos prontuários foi realizada seguindo protocolos

padronizados e previamente elaborados pelo Dr. René Aloisio da Costa Vieira, médico mastologista colaborador deste estudo. Nestes protocolos constam informações consideradas relevantes para o diagnóstico da paciente acometida pelo câncer de mama, bem como aspectos referentes às características clínicas e patológicas do tumor, ao tratamento e ao seguimento clínico da paciente (**Anexo A**).

Durante a revisão dos prontuários, os tumores da mama das pacientes incluídas no estudo foram classificados de acordo com o grau histológico, estadiamento tumoral e subtipo molecular. O grau histológico tumoral foi avaliado pelo sistema modificado de Scarff-Bloom-Richardson (SBR)³²⁴. Estadiamento tumoral foi realizado de acordo com sistema TNM proposto pela 7ª edição do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)³²⁵. A classificação em subtipo moleculares (luminal A; luminal B HER2-; luminal B HER2+; HER2+ e triplo negativo) foi realizado de acordo com o *13th St Gallen International Expert Consensus*³²⁶ (**Tabela 6**).

Subtipo molecular	RE*	RP*	Amplificação de HER2†	Ki67‡
Luminal A	Positivo	Positivo	Negativo	Baixa expressão
Luminal B HER2-	Positivo	Qualquer	Negativo	Alta expressão
Luminal B HER2+	Positivo	Qualquer	Positivo	Qualquer
HER2+	Negativo	Negativo	Positivo	Qualquer
Triplo negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Qualquer

Tabela 6 – Classificação dos subtipos moleculares de acordo com a expressão de marcadores moleculares.

*: Cutoff de positividade (IHQ): >1% das células tumorais reativas.

+: Cutoff de amplificação: IHQ score +3; ou razão de FISH ≥2.0.

‡: Cutoff de expressão aumentada (IHQ): índice igual ou superior a 14%.

RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; IHQ: imuno-histoquímica; FISH: *fluorescence in situ hybridization*.

A avaliação dos marcadores imunohistoquímicos e genômicos tem sido realizada rotina prática do Departamento de Patologia do Hospital de Amor para a avaliação clínica do câncer de mama de acordo com as diretrizes atuais³²⁷⁻³²⁹.

Ao final, os protocolos preenchidos foram numerados, a fim de manter em sigilo a identidade pessoal das pacientes, e em seguida armazenados em caixa-arquivo localizado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Amor. Os dados coletados foram inseridos no software *RedCap* para manejo de banco de dados.

4.3 Amostras teciduais

Para a obtenção das amostras teciduais foram solicitados blocos de parafina contendo tecido normal ou tumoral das pacientes incluídas no estudo junto ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Amor, bem como as lâminas coradas em hematoxilinaeosina (HE) correspondentes de cada bloco. Nas ocasiões em que as lâminas estivessem ausentes ou inadequadas para avaliação e identificação da área de tecido normal ou tumoral, novas lâminas foram confeccionadas e coradas em HE.

Com intuito de confirmar o diagnóstico de câncer de mama, bem como garantir a normalidade dos tecidos das pacientes saudáveis, todas as lâminas foram previamente submetidas à revisão cega (*blind review*) pelo Dr. Lucas Faria Abrahao Machado e pela Dra. Iara Viana Vidigal Santana, médicos patologistas vinculados ao Departamento de Patologia da instituição e colaboradores do estudo. Os blocos FFPE das respectivas lâminas selecionadas foram previamente avaliados quanto à integridade e qualidade do material. Na ocasião, foram realizadas as identificações das áreas normais ou tumorais (>60% de células tumorais) representativas por marcação direta nas lâminas coradas em HE e nos blocos FFPE selecionados. Para obtenção do material biológico, os blocos selecionados foram submetidos a microdissecções sequenciais, sendo obtidas 5 lâminas contendo 2 cortes histológicos de 10 µm de espessura para cada caso/bloco. As lâminas coradas em HE com áreas previamente marcadas. Dessa forma, as áreas de tecido tumoral foram sobremarcadas diretamente nas lâminas contendo as microdissecções e dissecadas manualmente com agulhas descartáveis estéreis e transferidas para tubos previamente autoclavados e identificados.

4.4 Extração e quantificação do RNA total

A etapa de extração do RNA total das amostras teciduais foi precedida por tratamento com o *Deparaffinization Solution* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Após o processo de desparafinização, a extração do RNA total foi realizada no sistema automatizado

QIASymphony SP (QIAGEN, Hilden, Alemanha), utilizando o *QIASymphony RNA kit*, conforme protocolo do fabricante (protocolo RNA_130_FFPE). Cada amostra foi submetida à determinação da qualidade (pureza) e concentração utilizando o espectrofotômero NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) seguindo protocolo do fabricante. Ao final, as amostras obtidas após extração foram armazenadas em freezer à -80°C até o momento da análise molecular.

4.5 Análise da expressão de microRNAs

4.5.1 Ensaio nCounter da NanoString

Para análise dos perfis de expressão dos miRNAs, foi utilizado o painel *nCounter*[®] *miRNA Expression Assays* (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA), seguindo protocolo do fabricante. A tecnologia *nCounter* desenvolvida pela NanoString envolve a detecção digital de miRNAs através de contagens diretas e absolutas de *barcordes*.

Inicialmente, 100 ng/µL do RNA total das amostras foi submetido um tratamento prévio de preparação que envolveu etapas de anelamento e ligação de *tags* (do inglês, marcações) específicas para seus miRNAs alvos utilizando sequências *bridge* (do inglês, ponte), seguida de uma etapa de purificação para remoção de *tags* que não se ligaram. Após a preparação das amostras, estas foram hibridizadas com pares de *probes* (do inglês, sondas) de captura marcadas com biotina e *probes reporters* codificadas com combinações de quatro cores em seis posições (*color-code*). Este sistema *barcode* (do inglês, código de barras) garante a identificação multiplex específica de até 796 miRNAs-alvos previamente descritos na literatura e envolvidos na regulação de diversas patologias, inclusive no desenvolvimento e progressão do câncer (<u>https://www.nanostring.com/download file/view/301/3824</u>). As etapas de preparação e hibridização demandaram a utilização do *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para garantir o controle das temperaturas necessárias para as reações enzimáticas.

As últimas etapas do ensaio consistiram em processos automatizados. Após a hibridização dos pares de *probes*, as amostras passaram por um processo de lavagem para remoção das *probes* que não hibridizaram utilizando *beads* magnéticas complementares às *probes* no equipamento *nCounter Prep Station* (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA). Depois deste processo de purificação, as amostras foram eluídas e imobilizadas em cartuchos

cobertos com streptavidina através da ligação entre a biotina presentes nas *probes* de captura e a streptavidina presente nos cartuchos. Ao final, os cartuchos foram transferidos para o equipamento *nCounter Digital Analyzer* (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA) para captação dos sinais de fluorescência emitidos pelos *barcodes* e consequente detecção dos alvos.

4.5.2 Controle de qualidade

Os dados gerados pelo ensaio *nCounter* foram obtidos utilizando o *nSolverAnalysis Software* v2.6[®] (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA), um programa integrado de análise para armazenamento e controle de qualidade. Primeiro, a performance geral do ensaio é avaliada por meio da análise da qualidade da <u>captação das imagens</u> digitalizadas e <u>densidade de ligação</u>. Depois, o desempenho dos controles positivos é avaliado por meio dos parâmetros de <u>lineariedade dos controles positivos</u> e de <u>limite de detecção</u>. Por fim, é feita uma avaliação geral dos dados em <u>busca de possíveis *flags*</u>: amostras que apresentaram baixa eficiência no ensaio. A seguir tem-se a descrição de cada uma destas etapas de acordo com o *guideline* fornecido pela NanoString³³⁰:

<u>Captação das imagens</u>: Durante a detecção dos *barcodes* no sistema *nCounter*, cada *lane*/amostra é digitalizada e dividida em centenas de seções de imagens, denominas campos de visão (do inglês *field of views* – FOVs). O sistema quantifica o número de *barcodes* presentes em cada FOV separadamente e em seguida soma os valores obtidos para cada *lane* para definir a contagem final de cada um *barcodes* por amostra. Para avaliação da qualidade da <u>captação</u> <u>das imagens</u>, o sistema reporta a porcentagem de FOVs digitalizadas com sucesso: recomenda-se que ≥75% dos FOVs tenham sido captados.

Densidade de ligação: Durante a detecção dos barcodes no sistema nCounter, o sistema pode digitalizar imagens contendo *barcodes* sobrepostos na superfície do cartucho, o que pode prejudicar a contagem específica dos mesmos, causando saturação da imagem e consequente perda de dados. Para determinar o nível de saturação, o sistema calcula a <u>densidade de ligação</u> para determinar se as imagens captadas foram comprometidas. Altos valores de densidade (>2.25) indicam números consideráveis de barcodes sobrepostos, o que afeta a quantificação e linearieadade do ensaio.

Lineariedade dos controles positivos: Os controles positivos presentes no ensaio são quantificados para avaliação da eficiência das reações de hibridização. Estes controles apresentam concentrações que variam de maneira linear, permitindo que o sistema verifique a <u>linearidade dos controles positivos</u> (*POS_A* a *POS_F*) por meio da análise de regressão linear da contagem dos controles positivos. Valores de R² devem ser maiores de 0.95.

Limite de detecção: O input padrão de RNA total (100 ng) no ensaio corresponderia a aproximadamente ao conteúdo de RNA em 10.000 células (assumindo que cada célula contém 10 picogramas de RNA total). O sistema *nCounter* é capaz de detectar pelo menos 1 cópia de um transcrito por célula, isto é, 10.000 transcritos totais por ensaio. Portanto, a avaliação do limite de detecção é determinada pela capacidade de quantificação do controle positivo *POS_E*, cuja concentração corresponde a aproximadamente 10.000 cópias. Para avaliar se o *POS_E* é detectável, sua contagem é comparada à contagem de controles negativos, que foram desenvolvidos para não hibridizarem com nenhum alvo presente nas amostras. As contagens do *POS_E* devem ser maiores que duas vezes o desvio padrão acima da média dos controles negativos.

Busca por flags: Mesmo após a aplicação das etapas supracitadas, podem haver amostras que não passem pelo controle de qualidade. Estas amostras são marcadas como *flags* pelo sistema, que remete uma baixa eficiência potencial do ensaio. Dessa forma, é preciso verificar as possíveis causa e determinar se será necessário descartar os dados das amostras.

Ao final, todas as amostras utilizadas no presente estudo passaram pelo controle de qualidade e os dados brutos fornecidos pelo programa, isto é, as contagens absolutas dos miRNAs analisados em cada experimento, foram importados no ambiente estatístico R (R-project v3.2.1; The R Foundation, Viena, Áustria) para o seguimento do processamento dos dados.

4.5.3 Normalização dos dados

Embora a plataforma NanoString seja considerada promissora, especialmente quando comparada a outras técnicas baseadas em hibridização (microarranjos) e em amplificação
(reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*; PCR)), trata-se de uma tecnologia relativamente nova que ainda requer a definição de abordagens padronizadas para o processamento e análise dos dados. Para o processamento dos dados brutos obtidos no presente estudo foi utilizado o pacote do R "NanoStringNorm" (v. 1. 1. 21), que foi desenvolvido com intuito de implementar métodos que permitiriam uma análise reprodutível e robusta de dados obtidos a partir da plataforma NanoString³³¹.

Logo após os dados serem submetidos ao método de *probe-level background correction*, os mesmos foram submetidos a um conjunto de etapas de normalização para correção de variações técnicas e biológicas entre as amostras e na eficiência dos ensaios. Foram utilizados os seguintes parâmetros: *code-count normalization*, por meio da média geométrica da contagem dos controles positivos; e conteúdo da amostra (*sample content*), por meio dos top 10 menores coeficientes de variação (*low coefficient value –* CV). Ao final, os dados normalizados foram transformados considerando log2, e então utilizados como *input* para análises posteriores.

4.5.4 Análise de expressão diferencial e de acurácia

A análise estatística de expressão diferencial no ambiente R foi realizado utilizando o pacote *limma* (*linear models for microarray data*) do Bioconductor, considerando valores de p < 0.05 e *fold changes* $\ge |2.0|$ entre os grupos avaliados. Os heatmaps apresentando os perfis de expressão dos miRNAs foram gerados utilizando o pacote *ComplexHeatmaps*.

Para avaliação da performance dos miRNAs diferencialmente expressos discriminar os grupos analisados, a performance foi estimada baseada em valores de área sob a curva ROC (*receiver-operating characteristic*) obtidos através do pacote *ROCR*.

4.6 Predição de alvos de microRNAs

A fim de avaliar o papel biológico dos miRNAs apontados como potenciais biomarcadores na etapa anterior, inicialmente foi aplicada análise de bioinformática para predição de alvos destes miRNAs utilizando o programa gratuito e disponível *online* miRDIP (<u>http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/</u>), focando somente nos Top 1% genes alvos preditos (*score class very high*). Este programa integra dezenas de ferramentas de predição de alvos de alvos de miRNAs, cada qual utilizando um determinado algoritmo, aumentando assim a acurácia da predição³³². Das listas de genes geradas, foram selecionados alvos preditos por pelo menos

três dos seguintes algoritmos de predição: DIANA, microrna.org, RNA22, RNAHybrid e TargetScan.

Subsequentemente, considerando o mecanismo pelo qual os miRNAs regulam a expressão de seus genes alvos e o consequente impacto na carcinogênese e progressão tumoral, foram apenas selecionados genes anteriormentes descritos como supressores tumorais ou oncogenes de acordo com o Católogo de Mutações Somáticas em Câncer (do inglês: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, COSMIC). As listas obtidas após a aplicação de todos os filtros descritos foram usadas como dados de input para análises posteriores no Cytoscape (v. 3.6.1), um software gratuito para integração, visualização e análise de redes regulatórias³³³.

4.7 Enriquecimento de vias biológicas

A fim de avaliar se os miRNAs evidenciados cooperariam entre si para afetar processos e vias biológicas associados ao câncer de mama, foram realizados análises de enriquecimento de vias utilizando o ReactomeFIViz (v. 7.0.1), um plugin do Cytoscape que fornece redes de interações regulatórias e vias biológicas curadas e derivadas do Reactome e outros banco de dados³³⁴. Para este fim, somente genes associados ao carcinoma mamário (*breast carcinoma*) de acordo com o *Cancer Gene Index Annotations* (fornecido pelo *National Cancer Institute*, NCI) foram selecionados para as análises através da função *Load Cancer Index* disponível no ReactomeFIViz. Com o propósito de aumentar a acurácia da análise, somente foram consideradas: (i) vias biológicas com valores de FDR \leq 0.001; e (ii) vias biológicas com pelo menos três genes envolvidos.

4.8 Análise estatística

Dados clínicos e patológicos da população de estudo foram representados por frequências e porcentagens para variáveis qualitativas, e por valores médios ± desvio padrão (DP) para variáveis contínuas. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para comparação dos dados categóricos entre os grupos. Na avaliação de variáveis contínuas, cujas distribuições de normalidade foram confirmadas através do Teste Shapiro-Wilk, utilizou-se o Test T de Student para comparação dos valores médios. A significância estatística foi baseada em *p* valor <0.05. As análises estatísticas foram realizadas no *software SPSS Statistics for Windows*, v. 20.0 (IBM,

Armonk, Nova Iorque, EUA) e gráficos das curvas ROC foram construídos usando o *GraphPad Prism*, v. 7.00 (San Diego, CA, EUA).

4.9 Aspectos éticos

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII, SP, Brasil (CEP) e se encontra aprovado (**CEP processo:** 950/2015; **Anexo B**). Não foi necessário a aquisição do termo de consentimento informado específico do projeto, pois o estudo foi realizado a partir de casos selecionados obtidos do arquivo de anatomia patológica do Departamento de Patologia do Hospital de Amor, 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.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clinicopatológica da população de estudo

Para a análise global de expressão miRNAs, foram incluídas 43 pacientes diagnosticadas com câncer de mama hereditário, 23 com câncer esporádico e 8 pacientes saudáveis portadoras e não-portadoras de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. A **Tabela 7** apresenta a descrição dos dados clinicopatológicos desta população de estudo.

a		Hereditário	· · ·	Esporádico	normais	
Características	BRCA1	BRCA2	BRCAX	n = 23	BRCA1/2	WT
	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 14		<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 3
Clínica						
Idade ao diagnóstico						
Média (DP)	43.73 (8.30)	44.57 (11.18)	41.78 (12.14)	48.73 (10.45)	41.80 (5.89)	58.00 (9.16)
Variação	29 - 59	26 - 67	25 - 66	30 - 77	35 - 51	50 - 68
Patológicas*, n (%)						
Grau (SBR)					-	-
1	1 (6,7)	0	1 (7.1)	0		
2	4 (26.7)	5 (35.7)	6 (42.9)	3 (13)		
3	10 (66.7)	9 (64.3)	7 (50)	20 (87)		
RE					-	-
Negativo	12 (80)	4 (28.6)	5 (35.7)	17 (73.9)		
Positivo	3 (20)	10 (71.4)	9 (64.3)	6 (26.1)		
RP					-	_
Negativo	11 (73.3)	6 (42.9)	7 (50)	19 (82,6)		
Positivo	4 (26.7)	8 (57.1)	7 (50)	4 (17.4)		
Amplificação de HER2					-	-
Negativo	14 (93.3)	12 (85.7)	11 (78.6)	19 (82,6)		
Positivo	1 (6.7)	2 (14.3)	3 (21.4)	4 (17.4)		
Subtipo molecular					-	-
Luminal ⁺	4 (26.7)	11 (78.6)	9 (64.3)	6 (26.1)		
HER2+	0	0	2 (14.3)	1 (4.3)		
Triple-negativo	11 (73.3)	3 (21.4)	4 (21.4)	16 (69.6)		
TNM					-	_
I	2 (13.3)	0	3 (21.4)	1 (4.3)		
II	9 (60)	4 (28.6)	9 (64.3)	11 (47.8)		
III	3 (20)	8 (57.1)	1 (7.1)	10 (43.5)		
IV	1 (6.7)	2 (14.3)	1 (7.1)	1 (4.3)		

Tabela 7 – Características clinicopatológicas das pacientes incluídas no estudo.

*: Somente para tumores da mama.

+ Variável compreendendo os subtipos moleculares luminal A, luminal B HER2- e luminal HER2+.

WT, wild-type; DP, desvio padrão; SBR, Scarff-Bloom-Richardson; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona;

HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

A idade média ao diagnóstico da população de estudo foi de 45.52 (DP: 10.63), variando entre 25 e 77 anos (<u>dados não apontados na</u> **Tabela 7**). A idade média pouco variou entre as pacientes com câncer de mama hereditário e esporádico, que apresentaram valores médios entre 41.78 (DP: 8.30) e 48.73 (10.45). Quando foi observado que uma paciente com câncer esporádico incluída no estudo possuía idade ao diagnóstico inferior a 35 anos, foi solicitado ao Departamento de Diagnóstico Molecular o rastreamento de variantes em *BRCA1, BRCA2* e outros genes de alto risco desta paciente a partir de amostras de sangue disponíveis no Biobanco da instituição. Foi constatado que esta paciente não possuía variantes patogênicas em ambos os genes de acordo com o ClinVar (**ANEXO C**), eliminando, portanto, o viés de inclusão de um caso falso-negativo. Quanto às pacientes saudáveis, as portadoras de mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* apresentaram idade média inferior quando comparadas às não-portadoras (41.80 e 58 anos, respectivamente).

Em relação às características patológicas dos tumores, a casuística compreendeu, em sua maioria, tumores com grau histológico 3, ausência de amplificação do HER2 e estadiamento clínicos II e III. No entanto, foi observada maior prevalência de casos com receptores hormonais (RE e RP) negativos, bem como o subtipo molecular triplo-negativo, entre tumores com variantes patogênicas em *BRCA1* (80% e 73.3%, respectivamente) e esporádicos (73.9% e 69.7%, respectivamente). Por outro lado, os tumores *BRCA2* e BRCAX foram majoritariamente representados pela positividade dos receptores hormonais e dos subtipos luminais.

5.2 Determinação de assinaturas de expressão de microRNAs

5.2.1 Perfis de expressão diferencial entre tumores esporádicos e tecidos normais

Com intuito de estabelecer assinaturas de expressão de miRNAs específicas para o câncer de mama hereditário, o primeiro passo foi a identificação de miRNAs diferencialmente expressos em amostras de tumores da mama esporádicos (*n* = 23) em relação aos tecidos normais da mama (*n* = 8) pelo ensaio *nCounter*. Foram identificados <u>48 miRNAs com expressões aumentadas</u> (miR-610; miR-429; miR-202-3p; miR-593-3p; miR-4488; miR-575; miR-4516; miR-663a; miR-326; miR-652-3p; miR-664b-3p; miR-539-3p; miR-365b-5p; miR-1469; miR-219a-1-3p; miR-545-3p; miR-125a-3p; miR-99b-5p; miR-1180-3p; miR-331-3p; miR-193a-3p; miR-551a; miR-539-5p; miR-128-1-5p; miR-874-5p; miR-24-3p; miR-450a-1-3p; miR-

615-5p; miR-487b-3p; miR-627-3p; miR-137; miR-887-5p; miR-934; miR-5001-3p; miR-379-5p; miR-485-3p; miR-513a-3p; miR-362-3p; miR-487b-5p; miR-2053; miR-1260b; miR-3150b-3p; miR-3179; miR-3202; miR-4284; miR-4792; miR-606; miR-337-5p), e <u>1 miRNA com expressão</u> reduzida nos tumores esporádicos (miR-145-5p). A **Figura 11** apresenta o gráfico de cores (*heatmap*) gerado após o agrupamento supervisionado destes miRNAs diferencialmente expressos.



Figura 11 – Heat map do agrupamento supervisionado dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores esporádicos e tecidos normais da mama. Cada coluna indica uma amostra e cada linha, um miRNA. Cor vermelha indica expressão aumentada e verde, expressão reduzida. WT: *wild-type* (remete à ausência de variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*). Normal BRCA: presença de variantes patogênicas em *BRCA1* ou *BRCA2*.

5.2.2 Perfis de expressão diferencial entre tumores hereditários e tecidos normais

O próximo passo foi identificar miRNAs diferencialmente expressos em amostras de tumores hereditários (n = 43) em relação aos tecidos normais da mama (n = 8). Foram identificados <u>28 miRNAs com expressões significativamente aumentadas</u> nos tumores hereditários (miR-135b-5p; miR-4454 + miR-7975; miR-539-5p; miR-196a-5p; miR-141-3p; miR-200b-3p; miR-200c-3p; miR-342-3p; miR-99b-5p; miR-125a-5p; miR-191-5p; miR-181a-5p; miR-20a-5p + miR-20b-5p; miR-22-3p; miR-24-3p; miR-25-3p; miR-93-5p; miR-15b-5p; let-

7d-5p; miR-19b-3p; miR-106a-5p + miR-17-5p; miR-29b-3p; miR-106b-5p; miR-142-3p; miR-32-5p; miR-21-5p; miR-15a-5p; and miR-16-5p), mas nenhum miRNA com expressão reduzida.

Como apresentado no *heatmap* gerado a partir da análise de agrupamento supervisionado (**Figura 12**), foi possível observar perfis de expressão distintos entre os grupos analisados, onde o grupo de tumores hereditários apresentaram majoritariamente uma assinatura molecular de miRNAs com expressão aumentada. Interessantemente, também foi observado que as amostras de tecidos normais de portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*, em relação aos demais tecidos normais da mama de pacientes não-portadoras, apresentaram expressão aberrante para alguns miRNAs específicos, sugerindo possíveis diferenças biológicas entre estes tecidos.



Figura 12 – Heat map do agrupamento supervisionado dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores hereditários e tecidos normais da mama. Cada coluna indica uma amostra e cada linha, um miRNA. Cor vermelha indica expressão aumentada e verde, expressão reduzida. WT: *wild-type* (remete à ausência de variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*). Normal_BRCA: presença de variantes patogênicas em *BRCA1* ou *BRCA2*. TH: tumores hereditários.

5.2.3 Identificação de microRNAs comuns e específicos entre tumores hereditários e esporádicos.

Com o propósito de evidenciar miRNAs envolvidos especificamente no contexto do câncer de mama hereditário, foi construído um diagrama de Venn para auxiliar na identificação de miRNAs diferencialmente expressos que fossem exclusivos e compartilhados entre os tumores da mama hereditários e esporádicos quando comparados aos tecidos normais (Figura 13). Foram identificados o total de <u>3 miRNAs (miR-99b-5p; miR-539-5p; e miR-24-3p) comumente desregulados</u> entre os grupos avaliados. Além disso, foram identificados 25 miRNAs que apresentaram expressão diferencial exclusiva para os tumores hereditários. Uma vez que um dos objetivos do presente estudo foi avaliar o potencial papel biológico dos miRNAs como biomarcadores no câncer de mama hereditário, estes 3 miRNAs compartilhados entre os tumores hereditários e esporádicos foram excluídos das análises posteriores para identificação de potenciais biomarcadores de diagnóstico.



Figura 13 – Diagrama de Venn contendo a lista dos miRNAs diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre tumores hereditários e esporádicos da mama. Ao todo, 25 miRNAs estavam especificamente desregulados em tumores hereditários, e 47 em tumores esporádicos.

5.2.4 Avaliação da acurácia dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores hereditários e tecidos normais da mama.

A análise da curva ROC foi realizada para avaliação da acurácia dos miRNAs exclusivamente expressos para discriminar tumores da mama hereditários dos tecidos normais. A **Tabela 8** apresenta as taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia de cada miRNA.

microRNA	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Cutoff
miR-200b-3p	72%	87%	0.81	6.07
miR-25-3p	65%	87%	0.82	5.55
miR-29b-3p	70%	87%	0.82	6.84
miR-135b-5p	79%	75%	0.84	2.29
miR-342-3p	70%	87%	0.84	5.72
miR-106a-5p + miR-17-5p	67%	87%	0.84	4.45
miR-125a-5p	86%	75%	0.86	4.75
miR-200c-3p	72%	100%	0.87	7.75
miR-181a-5p	74%	87%	0.87	6.31
miR-20a-5p + miR-20b-5p	79%	87%	0.87	4.99
miR-19b-3p	74%	87%	0.87	4.35
let-7d-5p	76%	100%	0.88	6.35
miR-15a-5p	77%	100%	0.88	4.99
miR-4454 + miR-7975	79%	100%	0.90	13.59
miR-15b-5p	81%	87%	0.90	4.79
miR-21-5p	81%	100%	0.90	7.09
miR-16-5p	84%	87%	0.90	5.99
miR-141-3p	84%	100%	0.91	5.39
miR-22-3p	84%	100%	0.91	3.79
miR-142-3p	83%	100%	0.91	6.04
miR-196a-5p	84%	100%	0.93	4.07
miR-191-5p	86%	100%	0.93	5.84
miR-106b-5p	91%	87%	0.93	3.49
miR-32-5p	84%	100%	0.93	3.09
miR-93-5p	91%	100%	0.95	4.88

Foi observado que todos os miRNAs avaliados apresentaram alta performance diagnóstica, com valores de AUC variando entre 0.81-0.95. Estes achados sugerem que estes miRNAs podem atuar como potenciais biomarcadores uma vez que exibiram altas taxas de sensibilidade (65-91%) e especificidade (75-100%) para determinação do câncer de mama hereditário em relação aos tecidos normais da mama. A análise de curva ROC também foi empregada para determinar a acurácia destes mesmos miRNAs para discriminar, separadamente, os tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX dos tecidos normais (**Tabela 9**). Confirmando os achados anteriores de quando os grupos foram avaliados em conjunto, foram observadas taxas satisfatórias de acurácia para determinação específica de tumores BRCA1 (AUC: 0.70-0.94), BRCA2 (AUC: 0.76-0.94), e BRCAX (AUC: 0.85-1.0).

	Normal vs. BRCA1		N	Normal vs. BRCA2			Normal vs. BRCAX					
microRNA	Sen	Esp	AUC	Cutoff	Sen	Esp	AUC	Cutoff	Sen	Esp	AUC	Cutoff
miR-200b	80%	62%	0.72	4.82	78%	87%	0.83	6.07	85%	87%	0.87	6.18
miR-25-3p	86%	62%	0.75	3.59	71%	87%	0.83	5.62	71%	100%	0.90	6.05
miR-29b-3p	86%	50%	0.70	5.15	71%	87%	0.78	6.85	92%	100%	0.97	7.69
miR-135b-5p	80%	75%	0.83	2.30	78%	62%	0.76	2.25	85%	87%	0.91	2.80
miR-342-3p	66%	62%	0.70	5.09	78%	87%	0.84	5.75	85%	100%	0.96	6.23
miR-106a-5p + miR-17-5p	60%	100%	0.80	4.90	64%	100%	0.80	4.75	78%	87%	0.91	4.45
miR-125a-5p	80%	75%	0.79	4.75	71%	100%	0.86	6.22	85%	87%	0.93	5.46
miR-200c	86%	75%	0.88	7.05	71%	100%	0.86	8.03	78%	100%	0.85	7.75
miR-181a-5p	73%	75%	0.77	6.07	85%	75%	0.85	5.65	92%	100%	0.99	6.84
miR-20a-5p + miR-20b-5p	66%	87%	0.80	5.16	71%	100%	0.83	5.78	92%	100%	0.99	5.38
miR-19b	60%	87%	0.80	4.53	71%	87%	0.84	4.35	92%	87%	0.96	4.44
let-7d-5p	73%	75%	0.83	5.94	71%	100%	0.82	6.35	100%	100%	1.0	6.62
miR-15a-5p	60%	100%	0.80	4.99	71%	100%	0.83	5.40	100%	100%	1.0	6.07
miR-4454 + miR-7975	73%	100%	0.87	13.66	71%	87%	0.82	13.34	100%	100%	1.0	13.86
miR-15b-5p	93%	75%	0.88	4.32	71%	100%	0.83	6.47	100%	100%	1.0	6.05
miR-21-5p	60%	100%	0.80	7.23	85%	100%	0.90	7.09	100%	100%	1.0	7.95
miR-16-5p	73%	87%	0.86	6.01	78%	87%	0.84	5.99	100%	100%	1.0	6.62
miR-141-3p	80%	100%	0.91	5.39	78%	100%	0.89	6.07	92%	100%	0.92	5.75
miR-22-3p	86%	87%	0.91	3.44	78%	100%	0.82	4.13	100%	100%	1.0	4.17
miR-142-3p	86%	100%	0.94	6.04	71%	100%	0.82	7.36	92%	100%	0.98	6.95
miR-196a-5p	73%	100%	0.87	4.27	85%	100%	0.94	4.22	92%	100%	0.98	4.07
miR-191-5p	80%	87%	0.85	5.62	92%	100%	0.94	5.86	100%	100%	1.0	5.89
miR-106b-5p	93%	87%	0.91	3.49	78%	87%	0.88	3.67	92%	100%	0.99	4.73
miR-32-5p	60%	100%	0.80	7.23	85%	100%	0.90	7.09	100%	100%	1.0	7.95
miR-93-5p	86%	100%	0.94	4.88	85%	100%	0.90	4.90	100%	100%	1.0	5.88

Tabela 9 – Performance diagnóstica dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tipos de tumores hereditários (BRCA1, BRCA2 ou BRCAX) e tecidos normais da mama.

Sen, sensibilidade; Esp, especificidade; AUC, area under the curve.

5.2.5 Perfis de expressão diferencial entre tumores da mama hereditários associados ao BRCA1, BRCA2 e BRCAX.

Com intuito de investigar se determinados miRNAs também poderiam classificar os tumores hereditários associados ao *BRCA1*, *BRCA2* e BRCAX, foi realizado o teste de ANOVA para identificação de miRNAs diferencialmente expressos entre estes tumores. A **Figura 14A** apresenta no *heatmap* gerado a partir do agrupamento supervisionado miRNAs evidenciados na análise.





Foram evidenciados <u>19 miRNAs diferencialmente expressos</u> entre os grupos: 17 com expressão aumentada (miR-140-5p; miR-99a-5p; miR-199a-5p; miR-100-5p; miR-30a-5p; miR-199a-3p+miR-199b-3p; miR-199b-5p; let-7c-5p; miR-23a-3p; miR-29c-3p; miR-424-5p; miR-15a-5p; miR-125b-5p; let-7g-5p; miR-126-3p; miR-451a; miR-148a-3p); e 2 com expressão reduzida (miR-3065-5p; miR-122-5p). Como observado no *heatmap* (Figura 14A), o grupo de tumores BRCAX apresentou um padrão de expressão reduzida (<u>Cluster 2</u>). Além disso, também foi observado que a maioria dos tumores BRCA2 apresentaram perfis de expressão similares aos apresentados pelos tumores BRCAX, especialmente em relação aos miRNAs com expressão aumentada. No entanto, importa mencionar que estes miRNAs exibiram maiores valores médios de *fold change* entre as amostras de tumores da mama BRCAX quando comparado aos tumores BRCA1 e BRCA2 (Figura 14B), enquanto que os miRNAs pouco expressão de miRNAs poderiam representar uma assinatura molecular específica dos tumores BRCA2 e, especialmente, dos tumores BRCA1.

Considerando que na análise de caracterização clinicopatológica (seção 5.1) da população de estudo foi evidenciado que os tumores da mama associados ao BRCA2 e BRCAX eram majoritariamente representados pelos subtipos luminais, enquanto grande parte dos tumores BRCA1 foram classificados como triplo negativos. Embora os tumores BRCAX tenham apresentado valores de fold change significativamente maiores ou menores em relação ao apresentado pelos tumores BRCA1 e BRCA2, surgiu a hipótese de que os perfis de expressão dos miRNAs evidenciados poderiam ser influenciados ou dependentes do subtipo molecular. Com o propósito de investigar esta questão, foi realizada uma análise de associação entre o status de expressão cada miRNA e o subtipo triplo negativo (Tabela 10). Foi observada associação positiva e significativa entre o subtipo molecular triplo-negativo e o padrão de expressão de 10 miRNAs (miR-199a-5p; miR-30a-5p; miR-199a-3p+miR-199b-3p; miR-199b-5p; let-7c-5p; miR-29c-3p; miR-125b-5p; let-7g-5p; e miR-126-3p) dos 19 evidenciados como diferencialmente expressos. Uma vez que um dos objetivos seria determinar assinaturas moleculares capazes de discriminar tumores hereditários independente das suas características fenotípicas, estes miRNAs foram excluídos da análise de acurácia e identificação de potenciais biomarcadores.

microBNA		Triplo ne	· · ·	
Incionia	Expressão (<i>N</i> total)	Não	Sim	p valor*
miB-140-5n	Aumentada (18)	13 (72.2)	5 (27.5)	0 181
11111 I +0 5p	Reduzida (25)	13 (52)	12 (48)	0.101
miR-99a-5n	Aumentada (19)	14 (73.7)	5 (26.3)	0 115
	Reduzida (24)	12 (50)	12 (50)	0.110
miR-199a-5n	Aumentada (17)	14 (82.4)	3 (17.6)	0.018
11111 1990 SP	Reduzida (26)	12 (46.2)	14 (53.8)	0.010
mi8-100-5n	Aumentada (20)	15 (75)	5 (25)	0.069
100 Sp	Reduzida (23)	11 (47.8)	12 (52.2)	0.005
miR-30a-5n	Aumentada (17)	14 (82.4)	3 (17.6)	0.018
1111-30 2- 30	Reduzida (26)	12 (46.2)	14 (53.8)	0.010
miR-199a-3p+	Aumentada (20)	16 (80.0)	4 (20)	0.015
miR-199b-3p	Reduzida (23)	10 (43.5)	13 (56.5)	0.015
miR-199h-5n	Aumentada (17)	14 (82.4)	3 (17.6)	0.018
mm-1990-9b	Reduzida (26)	12 (46.2)	14 (53.8)	0.010
let-7c-5n	Aumentada (20)	16 (80)	4 (20)	0.015
	Reduzida (23)	10 (43.5)	13 (56.5)	0.015
miR-23a-3n	Aumentada (22)	16 (72.7)	6 (27.3)	0 092
11111 250 5p	Reduzida (21)	10 (47.6)	11 (52.4)	0.052
miB-29c-3n	Aumentada (20)	16 (80)	4 (20)	0.015
mm-230-3p	Reduzida (23)	10 (43.5)	13 (56.5)	0.015
miB-424-5n	Aumentada (22)	14 (63.6)	8 (36.4)	0 663
1111(°+2+°5p	Reduzida (21)	12 (57.1)	9 (42.9)	0.005
mi8-152-50	Aumentada (25)	17 (68)	8 (32)	0 23/
1111 ISU SP	Reduzida (18)	9 (50)	9 (50)	0.234
miR-125h-5n	Aumentada (21)	16 (76.2)	5 (23.8)	0 039
mm-1250-5p	Reduzida (22)	10 (45.5)	12 (54.5)	0.035
let-7g-5n	Aumentada (23)	17 (73.9)	6 (26.1)	0.053
let-18-2h	Reduzida (20)	9 (45)	11 (55)	0.055
miR-126-3n	Aumentada (23)	17 (73.9)	6 (26.1)	0.053
mm-120-5p	Reduzida (20)	9 (45)	11 (55)	0.055
miP_1/82_3n	Aumentada (19)	12 (63.2)	7 (36.8)	0 7/8
mm-140a-2h	Reduzida (24)	14 (58.3)	10 (41.7)	0.740
miP-4512	Aumentada (18)	13 (72.2)	5 (27.8)	Λ 101
1111N-4J1a	Reduzida (25)	13 (52)	12 (48)	0.101

Tabela 10 – Associação entre a expressão diferencial dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAx e o subtipo molecular triplo-negativo.

Continua na próxima página.

microBNA		Triplo ne		
	Expressão (<i>N</i> total)	Não	Sim	<i>p</i> valor
miR-3065-5n	Aumentada (20)	12 (60)	.2 (60) 8 (40)	
	Reduzida (23)	14 (60.9)	9 (39.1)	0.554
miR-122-5n	Aumentada (20)	12 (60)	8 (40)	0 954
Шк-122-5р	Reduzida (23)	14 (60.9)	9 (39.1)	0.554

Tabela 10 (Continuação) - Associação entre a expressão diferencial dos miRNAs diferencialmente expressos entre os tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAx e o subtipo molecular triplo-negativo

Teste de Qui-quadrado.

5.2.6 Identificação de potenciais biomarcadores para classificação de tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX.

Para identificação de potenciais biomarcadores capazes de classificar de forma acurada os tumores da mama hereditários, foi realizada a análise da curva ROC para avaliação das taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia de cada miRNA diferencialmente expresso entre os tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX (**Tabela 11**). Foi observado que os miRNAs avaliados apresentaram alta performance diagnóstica para distinguir os tumores BRCAX dos tumores BRCA1 (AUC: 0.80-0.99) e dos tumores BRCA2 (0.76-0.95). Por outro lado, os mesmos miRNAs não apresentaram performance satisfatória para a discriminação entre tumroes BRCA1 e BRCA2 (AUC: 0.51-0.72), sugerindo que estes miRNAs possuem um papel potencial de biomarcadores de tumores BRCAX.

Tabela 11 – Performance diagnóstica dos miRNAs diferencialmente expressos entre tumores BRCA1, BRCA2 e BRCAX.

microRNA		BRCA1 \	/s. BRCA	2	BRCA1 vs. BRCAX BRCAX					BRCA2 v	A2 vs. BRCAX	
	Sen	Esp	AUC	Cutoff	Sen	Esp	AUC	Cutoff	Sen	Esp	AUC	Cutoff
miR-140-5p	71%	66%	0.57	3.72	100%	86%	0.97	4.64	100%	85%	0.95	4.64
miR-99a-5p	64%	93%	0.72	5.56	100%	93%	0.99	5.69	78%	78%	0.82	6.40
miR-100-5p	71%	66%	0.63	4.09	85%	93%	0.93	5.55	85%	92%	0.89	5.55
miR-23a-3p	64%	73%	0.67	8.41	85%	86%	0.89	8.68	78%	71%	0.77	9.32
miR-424-5p	57%	73%	0.65	4.26	85%	86%	0.89	4.98	78%	68%	0.76	5.25
miR-15a-5p	64%	73%	0.61	6.61	78%	86%	0.91	6.96	71%	78%	0.77	7.14
miR-148a-3p	64%	60%	0.56	5.49	100%	66%	0.85	5.83	85%	64%	0.76	6.05
miR-451a	42%	73%	0.52	6.23	78%	80%	0.80	6.57	78%	64%	0.77	6.57
miR-3065-5p	71%	46%	0.54	4.10	66%	100%	0.83	2.71	71%	100%	0.85	4.10
miR-122-5p	57%	60%	0.51	4.59	73%	85%	0.80	2.16	71%	85%	0.79	1.21

Sen, sensibilidade; Esp, especificidade; AUC, area under the curve.

5.3 Predição de genes alvos e enriquecimento de vias biológicas

Dado que o principal papel dos miRNAs reside na regulação da expressão póstranscricional de múltiplos genes, a desregulação da expressão destas moléculas pode afetar a função de vários processos e vias biológicas. Portanto, para avaliação do possível impacto biológico dos miRNAs considerados como potenciais biomarcadores nas análises anteriores, foram realizadas análises de predição de genes alvos e, subsequentemente, análises de enriquecimento de vias biológicas para identificação de possíveis processos e vias biológicos afetados pela ação coletiva destes miRNAs.

5.3.1 Alvos putativos e vias potencialmente reguladas por microRNAs em tumores da mama hereditários

Com o propósito de obter melhor entendimento da carcinogênese dos tumores da mama hereditários, inicialmente foi realizada a predição de genes alvos dos 25 miRNAs diferencialmente expressos entre os tumores da hereditários e os tecidos normais da mama (miR-200b-3p; miR-25-3p; miR-29b-3p; miR-135b-5p; miR-342-3p; miR-106a-5p + miR-17-5p; miR-125a-5p; miR-200c-3p; miR-181a-5p; miR-20a-5p + miR-20b-5p; miR-19b-3p; let-7d-5p; miR-15a-5p; miR-4454 + miR-7975; miR-15b-5p; miR-21-5p; miR-16-5p; miR-141-3p; miR-22-3p; miR-142-3p; miR-196a-5p; miR-191-5p; miR-106b-5p; miR-32-5p; miR-93-5p). Durante a análise, não foram encontrados alvos preditos para o miR-4454 e o miR-7975. Logo, a análise de enriquecimento de vias biológicas rendeu o total 263 vias com significância estatística, 401 processos biológicos significativos (p value: <0,0001), envolvendo o total de 1402 genes alvos putativos para os demais miRNAs.

A **Tabela 12** apresenta as cinco vias biológicas que obtiveram maior significância estatística e os números de genes alvos preditos contidos em cada uma. Uma vez que todos os miRNAs avaliados apresentaram altos níveis de expressão, a tabela também lista os genes alvos preditos de cada via biológica que são classificados como supressores tumorais, bem como o número de miRNAs potencialmente envolvidos na regulação da expressão dos mesmos.

Tabela 12 – Enriquecimento de vias biológicas de miRNAs diferencialmente expressos entre tumores hereditários e tecidos normais da mama.

Rank	Vias biológicas	N° de genes preditos	Lista dos genes supressores tumorais	Nº de miRNAs
1	ErbB signaling pathway(K)	46	NRG1, STAT5B, CBL, CDKN1A, CDKN1B, MAP2K4, ERBB4.	14
2	MAPK signaling pathway(K)	100	TP53, MAP3K1, MAP2K4, NF1, FAS, CASP3, TGFBR2, ERBB4.	21
3	RNA Polymerase II Transcription(R)	176	CREBBP, EZH2, FBXW7, MSH2, FOXO3, FOXO1, PTEN, CDC73, CCNC, TP63, TP53, SMARCA4, BRCA1, EP300, ZFHX3, RB1, BARD1, CDKN1A, CDKN1B, NCOR1, NOTCH2, NOTCH1, CBFB, KLF4, RUNX1, ATM, FAS, TSC1, SMAD2, SMAD4, SMAD3, BAX.	23
4	AP-1 transcription factor network(N)	35	PTEN, TP53, CDKN1B, CBFB	20
5	Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2(N)	34	RHOA	2

K: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG); R: Reactome; N: National Cancer Institute (NCI).

Foi observado que a desregulação da expressão destes miRNAs pode afetar a expressão de múltiplos alvos que participam de processos biológicos relacionados com à <u>proliferação</u> <u>celular</u> (*ErbB signaling pathway; MAPK signaling pathway*), <u>angiogênese</u> (*signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2*) e <u>regulação da expressão gênica</u> (*RNA Polymerase II Transcription; AP-1 transcription factor network*). Também foi constatado que a maior parte dos miRNAs avaliados possivelmente cooperam na repressão de genes que codificam diversas proteínas de ligação, fosfatases e fatores de transcrição, além de genes pró-apoptóticos e mediadores da inativação das propriedades proliferativas da via de sinalização das MAPKs.

5.3.2 Alvos putativos e vias potencialmente reguladas por microRNAs em tumores da mama BRCAX.

Considerando que foram observados perfis de expressão de miRNAs altamente sensíveis e específicos para tumores da mama associados ao BRCAX, também foram realizados a predição de genes alvos dos miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para classificação destes tumores (miR-140-5p; miR-99a-5p; miR-100-5p; miR-23a-3p; miR-424-5p; miR-15a-5p; miR-148a-3p; miR-451a; miR-3065-5p; miR-122-5p) e, subsequentemente, análises de enriquecimento de vias biológicas possivelmente afetadas pela expressão aberrante destas moléculas. <u>Primeiro</u>, a análise foi realizada para os 8 miRNAs que apresentaram expressão aumentada com significância estatística (miR-140-5p; miR-99a-5p; miR-100-5p; miR-23a-3p; miR-424-5p; miR-15a-5p; miR-148a-3p; miR-451a). A análise de enriquecimento de vias biológicas revelou o total 269 vias biológicas significativas (*p* valor: <0,0001), envolvendo o total de 578 genes alvos putativos. A **Tabela 13** apresenta a lista das cinco vias biológicas que obtiveram maior significância estatística. Uma vez que estes miRNAs avaliados apresentaram altos níveis de expressão, a tabela também lista os genes alvos preditos de cada via biológica que são classificados como supressores tumorais, bem como o número de miRNAs potencialmente envolvidos na regulação da expressão dos mesmos.

Tabela 13 – Enriquecimento de vias biológicas para os miRNAs com expressão aumentada e apontados como biomarcadores para tumores da mama BRCAX.

Rank	Vias biológicas	N° de genes preditos	Lista dos genes supressores tumorais	Nº de miRNAs
1	MAPK signaling pathway(K)	63	NF1, MAP3K1, FAS, CASP3, TGFBR2, ERBB4.	4
2	RNA Polymerase II Transcription(R)	103	RB1, GATA3, CREBBP, RAD17, CDKN1B, NCOR2, FBXW7, NOTCH2, CBFB, FOXO3, FOXO1, PTEN, KLF4, TP63, RUNX1, FAS, TSC1, SMAD2, ZFHX3, SMAD4, SMAD3, ESR1	6
3	FoxO signaling pathway(K)	39	CREBBP, CDKN1B, FOXO3, FOXO1, PTEN, EP300, SMAD2, SMAD4, SMAD3, TGFBR2	5
4	Cellular senescence(K)	42	RB1, FOXO3, FOXO1, PTEN, TSC1, SMAD2, SMAD3, TGFBR2	5
5	Hepatitis B(K)	41	RB1, CREBBP, CDKN1B, JAK1, PTEN, STAT5B, MAP3K1, FAS, SMAD4, SMAD3, DDX3X, CASP3	5

K: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG); R: Reactome.

Foi observado que a desregulação da expressão destes miRNAs pode afetar a expressão de múltiplos alvos que participam de vias relacionadas com <u>proliferação celular</u> (*MAPK signaling pathway*), <u>regulação do ciclo celular</u>, <u>apoptose</u>, <u>resposta a danos no DNA</u> e <u>resistência ao estresse oxidativo</u> (*FoxO signaling pathway*), e senescência celular (*Cellular senescence*). Estes miRNAs também aparentam cooperar na regulação da expressão de várias proteínas de ligação e fatores de transcrição.

<u>Segundo</u>, novas análises funcionais foram realizadas, mas dessa vez para os miRNAs que apresentaram expressão reduzida com significância estatística (miR-3065-5p; miR-122-5p). A análise de enriquecimento de vias rendeu o total de 33 vias biológicas significativas (p valor:

<0.001), envolvendo o total de 73 genes alvos putativos. A **Tabela 14** apresenta a lista das cinco vias biológicas que obtiveram maior significância estatística. Uma vez que estes miRNAs avaliados apresentaram baixos níveis de expressão, a tabela também lista os genes alvos preditos de cada via biológica que são classificados como oncogenes, bem como o número de miRNAs potencialmente envolvidos na regulação da expressão dos mesmos.

Tabela 14 – Enriquecimento de vias biológicas para os miRNAs com expressão reduzida e apontados como biomarcadores para tumores da mama BRCAX.

Rank	Vias biológicas	N° de genes preditos	Lista dos genes supressores tumorais	Nº de miRNAs
1	PI3K-Akt signaling pathway(K)		MYB, AKT3, MET, FOXO3,	2
2	FGF signaling pathway(N)		CBL	miR-122-5p
3	Proteoglycans in cancer(K)		AKT3, MET, CBL, ESR1	miR-122-5p
4	Pathways in cancer(K)		AKT3, IL6ST, MET, CBL, ESR1	2
5	MAPK signaling pathway(K)		AKT3, MET	miR-122-5p

K: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG); N: National Cancer Institute (NCI).

Foi observado que a expressão reduzida destes miRNAs afetar a expressão de múltiplos alvos que participam de processos biológicos relacionados com a <u>cascata das MAPKs</u> (*MAPK signaling pathway*), e outras vias de <u>proliferação celular</u> (*PI3K-Akt signaling pathway*; *Proteoglycans in cancer; FGF signaling pathway*) (**Tabela 14**).

6 DISCUSSÃO

Embora a prevalência do câncer de mama hereditário seja significativamente inferior à prevalência dos casos esporádicos, são tumores causados por mutações germinativas em genes de predisposição ao câncer – isto é, indivíduos e familiares afetados apresentam maior risco de desenvolvimento de câncer ao longo da vida guando comparados à população em geral. Portanto, identificar e fornecer aconselhamento genético àqueles sob alto risco para a síndrome HBOC é essencial para avaliação de risco, estimação da probabilidade da presença de variantes patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 e consequente indicação do teste genético¹⁸⁴. Indivíduos e famílias portadoras destas variantes podem se beneficiar da intensificação de medidas para a detecção precoce, bem como de possíveis intervenções profiláticas para redução do risco, de suporte psicológico e de tratamento personalizado com drogas mais específicas (por exemplo, drogas platina e inibidores de PARP)¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Uma vez que o teste genético para o rastreamento de mutações em ambos os genes ainda é considerado caro e complexo do ponto de vista técnico, vários modelos de predição foram desenvolvidos para estimar previamente a probabilidade de um indivíduo ser portador de uma variante patogênica¹⁹⁸⁻²⁰³. Contudo, a performance dos modelos atualmente disponíveis é substancialmente limitada por subestimar indivíduos portadores de mutações que possuem dados insuficientes ou ausentes de história familiar. Além disso, estes modelos também têm apresentado baixas taxas de especificidade por considerar todos os casos sugestivos de HBOC como potenciais candidatos à pesquisa por mutações germinativas em BRCA1 e BRCA2, o que incluiria uma parcela significativa de pacientes BRCAX²⁰⁷⁻²¹³. Dessa forma, um dos esforços direcionados a melhorar este panorama tem sido a busca por biomarcadores para complementar os critérios de seleção adotados pelos modelos de predição, auxiliando na determinação acurada de portadores de mutações.

Biomarcadores de diagnóstico têm sido propostos para identificação de algumas síndromes de predisposição hereditária ao câncer, como os testes moleculares de instabilidade de microssatélites e de deficiência no reparo de mal pareamento do DNA (do inglês, *DNA mismatch repair*) para o câncer colorretal hereditário não-poliposo na síndrome de Lynch³³⁵, mas nenhum biomarcador efetivo tem sido indicado para a predição da síndrome HBOC associada ao *BRCA1* ou *BRCA2*. Muitos estudos têm investigado o papel dos miRNAs

como biomarcadores de diagnóstico no câncer de mama esporádico, mas pouco foi reportado no câncer de mama hereditário. Portanto, a proposta do presente estudo foi analisar os perfis de expressão de miRNAs em tumores e tecidos normais da mama de portadoras e nãoportadoras de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, com o propósito de investigar se miRNAs diferencialmente expressos poderiam discriminar os tumores hereditários.

Como esperado, as pacientes com câncer de mama pertencentes a famílias de alto risco para a síndrome HBOC incluídas no estudo apresentaram valores de idade média ao diagnóstico inferiores a 45 anos, que é um aspecto clínico típico de pacientes com câncer hereditário^{101,102}. Devido à inclusão de uma paciente com idade inferior a 35 anos, a idade média do grupo de tumores esporádicos foi menor do que o esperado (48 anos). Carraro e colaboradores reportaram em uma casuística brasileira envolvendo 54 pacientes muito jovens (<35 anos) com câncer de mama, que 37.5% eram portadoras de mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*, sendo 8.6% sem história familiar sugestiva de síndrome HBOC³¹⁶. Considerando este achado na população brasileira, houve a preocupação de garantir que a paciente muito jovem incluída no grupo de tumores esporádicos não possuísse variantes patogênicas em *BRCA1*, *BRCA2* ou em outros genes de alto risco. Como foi constatado através do teste genético que a mesma não era portadora destas alterações genéticas, não foi considerado que a paciente poderia enviesar de forma significativa as análises moleculares.

Em relação às características fenotípicas, foi observado os tumores associados ao *BRCA1* foram majoritariamente representados pelo *status* negativo dos receptores hormonais (RE e RP), e, consequentemente, pelo subtipo molecular triplo-negativo. Por outro lado, a maior parte dos tumores associados ao *BRCA2* e BRCAX foram classificados como luminais. Estes achados corroboram com os dados da literatura, que sugerem que os tumores da mama BRCA1 apresentam aspectos patológicos distintos dos tumores BRCA2 e BRCAX – que, por sua vez, são mais similares entre si^{124, 127-129, 131, 137-140}. Todavia, considerando o impacto dos subtipos moleculares do câncer de mama sobre a expressão dos miRNAs^{307, 336}, surgiu a hipótese de que estas diferenças entre os tumores hereditários poderiam enviesar a determinação dos biomarcadores. Assim, foi realizada uma análise de associação entre a expressão diferencial dos miRNAs evidenciados e o subtipo triplo negativo a fim de avaliar se a desregulação de cada miRNA seria um fator dependente do subtipo molecular. Ao final, foi decidido que aqueles miRNAs diferencialmente expressos que apresentaram associação

significativa fossem excluídos das análises de determinação de potenciais biomarcadores para reduzir o viés induzido diferentes subtipos moleculares.

Inicialmente, foi realizada a análise expressão diferencial de miRNAs em tumores da mama de pacientes pertencentes a famílias HBOC em relação aos tecidos normais da mama. Foram identificados o total 28 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos analisados (miR-135b-5p; miR-4454 + miR-7975; miR-539-5p; miR-196a-5p; miR-141-3p; miR-200b-3p; miR-200c-3p; miR-342-3p; miR-99b-5p; miR-125a-5p; miR-191-5p; miR-181a-5p; miR-20a-5p + miR-20b-5p; miR-22-3p; miR-24-3p; miR-25-3p; miR-93-5p; miR-15b-5p; let-7d-5p; miR-19b-3p; miR-106a-5p + miR-17-5p; miR-29b-3p; miR-106b-5p; miR-142-3p; miR-32-5p; miR-21-5p; miR-15a-5p; and miR-16-5p). Alguns destes miRNAs com expressão aumentada já foram consistentemente reportados em estudos prévios como desregulados em tumores esporádicos, especialmente o miR-21-5p, miRNA oncogênico cuja superexpressão tem sido associada com progressão da doença e mau prognóstico em pacientes com câncer de mama³³⁷. Interessantemente, também importa mencionar que a maior parte dos tecidos normais de pacientes portadoras de mutações em BRCA1 ou BRCA2 apresentaram alteração na expressão de alguns miRNAs quando comparado aos demais tecidos normais da mama. Em estudo publicado em 2006, Weber e colaboradores demonstraram que tecidos normais da mama de pacientes com história familiar sugestiva de HBOC (famílias BRCA1, BRCA2 e BRCAX) apresentam alterações genômicas em células epiteliais e estromais que potencialmente determinam a patogênese do câncer de mama hereditário³³⁸. Outros estudos também indicaram que tecidos normais da mama de mulheres saudáveis pertencentes a famílias de alto risco exibem mais alterações que tecidos normais de mulheres com baixo risco, com alterações genômicas, ampla desregulação da expressão gênica e proliferação aumentada³³⁹. Estes achados corroboram com a nossa observação, sugerindo que tecidos normais da mama de mulheres saudáveis portadoras de mutações podem apresentar alterações biológicas, mesmo antes de uma transformação neoplásica, provavelmente devido à instabilidade genômica provocada pela disfunção das proteínas BRCA1 e BRCA2.

Em seguida, foi realizada a análise global de expressão de miRNAs em tumores da mama esporádicos em relação aos tecidos normais da mama. O principal propósito desta análise foi identificar perfis de expressão específicos do câncer de mama esporádico para, posteriormente, investigar se algum miRNA evidenciado também possuía expressão alterada no câncer de mama hereditário. Foram evidenciados 49 miRNAs diferencialmente expressos, dentre os quais alguns com expressão alterada já reportada na literatura, como a expressão reduzida do miR-145-5p e expressão aumentada do miR-24-3p^{295, 340}. Quando os perfis de expressão dos tumores hereditários com os dos tumores esporádicos em relação aos tecidos normais da mama foram comparados, foram constatados três miRNAs comumente alterados: miR-99b-5p; miR-539-5p; e miR-24-3p. Similar ao que foi reportado por Tanic *et al* e Vos *et al*^{317, 318}, a evidência de que existam miRNAs comumente desregulados em tumores esporádicos e hereditários sugere que, provavelmente, estas moléculas desempenham um papel relevante no câncer de mama de modo geral, independente da origem esporádica ou hereditária, atuando na regulação da expressão de oncogenes e genes supressores tumorais relevantes para o processo da carcinogênese e progressão tumoral^{341, 342}.

Após a análise de acurácia, foi constatado que todos os miRNAs especificamente desregulados em tumores hereditários (miR-200b-3p; miR-25-3p; miR-29b-3p; miR-135b-5p; miR-342-3p; miR-106a-5p + miR-17-5p; miR-125a-5p; miR-200c-3p; miR-181a-5p; miR-20a-5p + miR-20b-5p; miR-19b-3p; let-7d-5p; miR-15a-5p; miR-4454 + miR-7975; miR-15b-5p; miR-21-5p; miR-16-5p; miR-141-3p; miR-22-3p; miR-142-3p; miR-196a-5p; miR-191-5p; miR-106b-5p; miR-32-5p; miR-93-5p) apresentavam boa performance para determinação de tumores hereditários BRCA1, BRCA2 e BRCAX. Nenhum destes miRNAs foi anteriormente reportado como superexpresso por estudos anteriores que investigaram o mesmo tipo de amostra e casuística^{317, 318}. Uma das possíveis razões seria a respeito das diferentes tecnologias empregadas para o rastreamento de miRNAs diferencialmente expressos. Por exemplo, estes estudos se basearam primariamente na tecnologia dos microarranjos, que, embora ainda bastante utilizada na pesquisa, a técnica de microarranjos é considerada laboriosa e desvantajosa. especialmente por utilizar na análise DNA complementar sintetizado a partir de RNAm altamente íntegros (o que não é facilmente obtido a partir de tecidos FFPE ou outras amostras de baixa qualidade)²⁸⁹. No presente estudo, os perfis de expressão de miRNAs foram avaliados em amostras FFPE utilizando a tecnologia nCounter da NanoString, uma plataforma rápida, reprodutível, sensível para quantificação molecular em larga escala³⁴³⁻³⁴⁵.

Tem sido reportado que cerca de 10% dos tumores da mama esporádicos podem ser atribuídos a variantes germinativas patogênicas em genes de predisposição ao câncer de mama, incluindo mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*²¹⁵. Além disso, acredita-se que algumas

pacientes com câncer de mama sem história famíliar com mutações *de novo* têm sido subestimadas pelos modelos de predição atualmente disponíveis e poderiam se beneficiar da realização do teste genético³⁴⁶. Embora limitado em termos de números de espécimes utilizadas para a análise de expressão de miRNAs, Murria-Estal e colaboradores identificaram e validaram dois miRNAs (miR-4417 e miR-423-3p) que poderiam discriminar tumores da mama hereditários (BRCA1, BRCA2, and BRCAX) dos tumors esporádicos (70.1% de acurácia)³¹⁹. No presente estudo, os miRNAs apontados como potenciais biomarcadores atingiram valores ótimos de acurácia para determinação de tumores hereditários. Estes miRNAs poderiam ter um papel relevante para identificação de tumores da mama desenvolvidos a partir de mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*, e ainda por mutações ainda não identificadas (BRCAX), permitindo que pacientes esporádicos possam se beneficiar do teste genético, aconselhamento e tratamentos personalizados.

Dado o fato que um único miRNA pode interagir com múltiplos transcritos alvos, e vários podem cooperar na regulação de um único transcrito, a expressão aumentada destes miRNAs evidenciados poderia resultar na repressão de genes supressores tumorais envolvidos em diversos processos biológicos e propiciar a tumorigênese e progressão tumoral. Considerando este contexto, foram realizadas a identificação de genes alvos e enriquecimento de vias biológicas potencialmente reguladas por estes miRNAs com intuito de compreender suas possíveis funções biológicas no desenvolvimento tumoral do câncer de mama hereditário. A análise sugeriu que a expressão destes miRNAs possivelmente afeta várias vias de sinalização associadas ao câncer, à regulação da proliferação celular e da expressão gênica. A via de sinalização do ErbB foi a que obteve o maior nível de significância, seguida da via de sinalização das MAPKs. Ambas as vias desempenham funções importantes na regulação da proliferação celular, sobrevida e metastização, sendo, portanto, potenciais alvos terapêuticos em pacientes com câncer de mama^{347, 348}. De acordo com a análise de predição, diversos genes com atividade anti-tumoral são alvos preditos dos 25 miRNAs evidenciados como potenciais biomarcadores de tumores hereditários, por exemplo, p21, p27, p53, CBL, STAT5B, CASP3, e TGFBR2. Este achado sugere que a identificação destes miRNAs pode contribuir para o melhor entendimento da carcinogênese de tumores hereditários e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No entanto, uma vez que tumores BRCAX também foram incluídos entre os casos de câncer de mama hereditário, seriam necessários mais estudos para investigar os genes alvos e vias de sinalização especificamente desregulados em tumores da mama com variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*.

A análise de expressão de miRNAs entre os tumores hereditários evidenciou 19 miRNAs diferencialmente expressos. A literatura tem demonstrado que os tumores da mama BRCAX tendem a ser bastante heterogêneos à nível de expressão gênica e que poderiam ser subclassificados em pelo menos dois grupos com diferentes assinaturas moleculares^{349, 350}. Corroborando com estes achados, Tanic e colaboradores reportaram em outro estudo que perfis de expressão de miRNAs poderiam subclassificar os tumores BRCAX em quatro grupos distintos³⁵¹. Interessantemente, foi observado no presente estudo um perfil de expressão de miRNAs homogêneo no grupo de tumores BRCAX e distinto em relação aos tumores BRCA1 e BRCA2, sugerindo que estes miRNAs poderiam representar uma assinatura molecular específica dos tumores BRCAX. Tanic e colaboradores desenvolveram um painel de biomarcadores capazes de discriminar tumores *BRCA1* e *BRCA2* de tumores não-mutados com alta acurácia (92%) a partir do ensaio de RT-PCR³²⁰. Após a filtragem dos miRNAs cuja expressão diferencial era dependente do subtipo molecular, foi observado que os 8 miRNAs selecionados (miR-140-5p; miR-99a-5p; miR-100-5p; miR-23a-3p; miR-424-5p; miR-15a-5p; miR-148a-3p; miR-451a; miR-3065-5p; miR-122-5p) foram capazes de discriminar tumores BRCAX dos tumores BRCA1 e BRCA2 com alta acurácia, mas não discriminar tumores BRCA1 de tumores BRCA2. No entanto, importa considerar que Tanic e colaboradores também não distinguiram tumores da mama BRCA1 e BRCA2 com base na análise de expressão de miRNAs³²⁰, sugerindo que mais estudos incluindo grandes casuísticas são necessárias para analisar as diferenças moleculares sutis entre estes grupos.

A fim de fornecer um melhor entendimento da biologia dos tumores hereditários que possuem origem genética desconhecida, também foram aplicadas análises de predição de alvos e enriquecimento de vias biológicas para os 8 miRNAs diferencialmente expressos em tumores BRCAX. As análises sugeriram que estes miRNAs podem afetar a expressão de dezenas de genes envolvidos em processos biológicos associados com proliferação celular, regulação do ciclo celular, apoptose, resposta a danos no DNA e resistência ao estresse oxidativo. As vias de sinalização das MAPK e PI3K-Akt foram as mais significativas para os miRNAs com expressão aumentada e reduzida, respectivamente. Ambas as vias estão comumente desreguladas no câncer de mama³⁵², o que sugere que a ativação das mesmas

pode representar um processo essencial da carcinogênese da mama. Por outro lado, grande parte dos genes alvos preditos atuam na via de sinalização dos FoxOs, uma família de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose, metabolismo de glicose e reparo de danos no DNA³⁵³. O mecanismo regulatório principal destas proteínas envolve sua fosforilação pela via PI3K-Akt em resposta a fatores de crescimento e insulina, resultando na exportação das FoxOs do núcleo para o citoplasma e reduzindo a expressão de seus genes alvos^{354, 355}. Por outro lado, a via de sinalização JNK, ativada por fatores de estresse oxidativo, estimula a ativação das proteínas Foxos³⁵⁶. Diversos estudos têm demonstrado o papel dos FoxOs na tumorigênese, sendo sugerido que estes fatores de transcrição possuem papel de supressores tumorais em vários tipos de tumores, incluindo o câncer de mama³⁵⁷. Considerando que os dados apresentados no presente estudos sugerem que esta via pode estar especialmente desregulada em tumores BRCAX em relação aos tumores BRCA1 e BRCA2, alvos terapêuticos que visem a restauração desta via podem ser explorados como possíveis estratégias de tratamento para tumores BRCAX.

7 CONCLUSÕES

I. Foram identificados três miRNAs diferencialmente expressos (miR-99b-5p; miR-539-5p; e miR-24-3p) e compartilhados entre tumores da mama hereditários e esporádicos por meio do ensaio *nCounter* da NanoString, sugerindo a importância destes miRNAs na carcinogênese e progressão tumoral do câncer de mama independente da origem genética.

II. Tecidos normais da mama de portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1* ou *BRCA2* apresentaram alteração nos perfis de expressão de miRNAs quando comparados aos tecidos normais de não-portadoras, observação que sugere que alterações biológicas podem ser apresentadas mesmo antes de uma provável transformação maligna devido à instabilidade genômica causada pela disfunção de BRCA1 e BRCA2.

III. Foram evidenciados 25 miRNAs específicos e diferencialmente expressos entre tumores hereditários e tecidos normais (miR-200b-3p; miR-25-3p; miR-29b-3p; miR-135b-5p; miR-342-3p; miR-106a-5p + miR-17-5p; miR-125a-5p; miR-200c-3p; miR-181a-5p; miR-20a-5p + miR-20b-5p; miR-19b-3p; let-7d-5p; miR-15a-5p; miR-4454 + miR-7975; miR-15b-5p; miR-21-5p; miR-16-5p; miR-141-3p; miR-22-3p; miR-142-3p; miR-196a-5p; miR-191-5p; miR-106b-5p; miR-32-5p; miR-93-5p). Por meio da análise de performance diagnóstica, todos os miRNAs demonstraram alta acurácia para discriminação de tumores hereditários (BRCA1, BRCA2 e BRCAX) dos tecidos normais da mama, sugerindo o papeis de possíveis biomarcadores a estes miRNAs.

IV. Foram evidenciados 8 miRNAs diferenciamente expressos entre os tumores mama hereditário independentes do subtipo molecular (miR-140-5p; miR-99a-5p; miR-100-5p; miR-23a-3p; miR-424-5p; miR-15a-5p; miR-148a-3p; miR-451a), e cujos perfis de expressão se apresentaram marcadamente específicos para tumores BRCAX. Por meio da análise de performance diagnóstica, todos os miRNAs demonstraram alta acurácia para discriminação de tumores BRCAX dos tumores BRCA1/2. No entanto, a performance não se demonstrou eficaz para discriminação de tumores BRCA1 de tumores BRCA2, sugerindo um provável papel de biomarcadores específicos para tumores da mama BRCAX. V. Por meio de análises com ferramentas de bioinformática, foi possível observar que os 25 miRNAs diferencialmente expressos entre tumores hereditários e tecidos normais da mama podem afetar a expressão de dezenas de genes especialmente envolvidos em processos biológicos associados à proliferação celular. Contudo, considerando que tumores BRCAX também foram incluídos na análise de expressão diferencial, acredita-se que seriam necessários mais estudos para investigar os genes alvos e vias de sinalização especificamente desregulados em tumores da mama com variantes patogênicas em BRCA1 e BRCA2.

VI. A análise de predição de alvos e enriquecimento de vias biológicas dos 8 miRNAs diferencialmente expressos entre tumores BRCAX e tumores BRCA1/2 demonstrou, além de vias de proliferação celular tipicamente alteradas no câncer de mama esporádico (vias de sinalização das MAPK e PI3K-Akt), que a desregulação destes miRNAs pode afetar a expressão de genes envolvidos na via de sinalização dos Foxos, supressores tumorais comumente associados com processos de regulação do ciclo celular, apoptose, resposta a danos no DNA e resistência ao estresse oxidativo. Estes achados sugerem a possibilidade de investigação de novos alvos terapêuticos que poderiam ser direcionados à pacientes de famílias BRCAX.

REFERÊNCIAS

1. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clin Anat.** 2013;26(1):29–48.

2. Tordonato C, Di Fiore PP, Nicassio F. The role of non-coding RNAs in the regulation of stem cells and progenitors in the normal mammary gland and in breast tumors. **Front Genet.** 2015;6:72.

3. Stricker, TP; Kumar, V. *Neoplasia*. In: Kumar, V et al., editors. *Robbins Patologia Básica*. **Rio de Janeiro**: **Saunders**; 2008, Cap. 6, p. 187-243.

4. Wellings SR. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. **Pathol Res Pract**. 1980;166(4):515–35.

5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell.** 2000;100(1):57–70.

6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** 4 de março de 2011;144(5):646–74.

7. Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? J Clin Invest. 2011;121(10):3789–96.

8. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. J Clin Invest. 2011;121(10):3786–8.

9. Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care (Basel)**. 2013;8(2):149–54.

10. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **Br J Cancer.** 2005;93(9):1046–52.

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

12. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**. 2010;12(4):207.

13. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? **Mol Oncol**. 2010;4(3):192–208.

14. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 2000;124(7):966–78.

15. Benson JR, Weaver DL, Mittra I, Hayashi M. The TNM staging system and breast cancer. **Lancet Oncol**. 2003;4(1):56–60.

16. Jahanzeb M. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. **Clin Breast Cancer**. 2008;8(4):324–33.

17. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. **J Clin Oncol**. 2014;32(21):2255–69.

18. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** 2000;406(6797):747–52.

19. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**. 2009;360(8):790–800.

20. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2003;100(14):8418–23.

21. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003;100(18):10393–8.

22. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**. 2018;68(6):394-424.

23. Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [Internet] Rio de Janeiro: INCA; 2018 [citado em 7 de Maio de 2019]; Disponível em: <u>http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018</u>.

24. da Costa AM, Hashim D, Fregnani JHTG, Weiderpass E. Overall survival and time trends in breast and cervical cancer incidence and mortality in the Regional Health District (RHD) of Barretos, São Paulo, Brazil. **BMC Cancer**. 2018 Nov 7;18(1):1079.

25. Vieira RA, Lourenço TS, Mauad EC, Moreira Filho VG, Peres SV, Silva TB, et al. Barriers related to non-adherence in a mammography breast-screening program during the implementation period in the interior of São Paulo State, Brazil. **J Epidemiol Glob Health**. 2015 Sep;5(3):211-9

26. Youlden DR, Cramb SM, Dunn NAM, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. **Cancer Epidemiol**. 2012;36(3):237–48.

27. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**. 2015;26(suppl 5):v8–30.

28. Li J, Shao Z. Mammography screening in less developed countries. **Springerplus**. 2015;4:615.

29. Silva TB, Mauad EC, Carvalho AL, Jacobs LA, Shulman LN. Difficulties in implementing an organized screening program for breast cancer in Brazil with emphasis on diagnostic methods. **Rural Remote Health**. 2013;13(2):2321.

30. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol**. 2012;13(3):e95–102.

31. Cecilio AP, Takakura ET, Jumes JJ, dos Santos JW, Herrera AC, Victorino VJ, et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer (Dove Med Press)**. 2015;7:43–9.

32. IARC monographs, International Agency for Research in Cancer. [Internet] Lyon: IARC; 2011 [citado em 24 de Outubro de 2016]; Disponível em: <u>http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php</u>

33. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny**. 2015;14(3):196-202.

34. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer.** 2002;87(11):1234–45.

35. Key J, Hodgson S, Omar RZ, Jensen TK, Thompson SG, Boobis AR, et al. Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. **Cancer Causes Control**. 2006;17(6):759–70.

36. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. **Ann Oncol**. 2013;24(2):301–8.

37. Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. **Arch Intern Med**. 2011;171(2):125–33.

38. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2013;105(8):515–25.

39. Dossus L, Boutron-Ruault M-C, Kaaks R, Gram IT, Vilier A, Fervers B, et al. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. **Int J Cancer**. 2014;134(8):1871–88.

40. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO, Kvåle G, Lund E, Meirik O, et al. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. **Int J Cancer**. 1990;46(4):597–603.

41. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. Lancet. 2002;360(9328):187–95.

42. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **Lancet Oncol**. 2012;13(11):1141–51.

43. Bodicoat DH, Schoemaker MJ, Jones ME, McFadden E, Griffin J, Ashworth A, et al. Timing of pubertal stages and breast cancer risk: the Breakthrough Generations Study. **Breast Cancer Res**. 2014;16(1):R18.

44. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. **Lancet**. 1996;347(9017):1713–27.

45. Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, et al. Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2013;22(11):1931–43.

46. Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Lowery WJ, Peragallo Urrutia R, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Oncol**. 2013;31(33):4188–98.

47. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. **JAMA.** 2000;283(4):485–91.

48. Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet**. 2003;362(9382):419–27.

49. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. **J Natl Cancer Inst**. 2013;105(8):526–35.

50. Boyle P, Boniol M, Koechlin A, Robertson C, Valentini F, Coppens K, et al. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. **Br J Cancer**. 2012;107(9):1608–17.

51. De Bruijn KMJ, Arends LR, Hansen BE, Leeflang S, Ruiter R, van Eijck CHJ. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. **Br J Surg**. 2013;100(11):1421–9.

52. Titus-Ernstoff L, Hatch EE, Hoover RN, Palmer J, Greenberg ER, Ricker W, et al. Long-term cancer risk in women given diethylstilbestrol (DES) during pregnancy. **Br J Cancer**. 2001;84(1):126–33.

53. Ahern TP, Lash TL, Sørensen HT, Pedersen L. Digoxin treatment is associated with an increased incidence of breast cancer: a population-based case-control study. **Breast Cancer Res**. 2008;10(6):R102.

54. Biggar RJ, Wohlfahrt J, Oudin A, Hjuler T, Melbye M. Digoxin use and the risk of breast cancer in women. **J Clin Oncol**. 2011;29(16):2165–70.

55. Ahern TP, Tamimi RM, Rosner BA, Hankinson SE. Digoxin use and risk of invasive breast cancer: evidence from the Nurses' Health Study and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**.;144(2):427–35.

56. Yang W-S, Deng Q, Fan W-Y, Wang W-Y, Wang X. Light exposure at night, sleep duration, melatonin, and breast cancer: a dose-response analysis of observational studies. **Eur J Cancer Prev**. 2014;23(4):269–76.

57. He C, Anand ST, Ebell MH, Vena JE, Robb SW. Circadian disrupting exposures and breast cancer risk: a meta-analysis. **Int Arch Occup Environ Health**. 2015;88(5):533–47.

58. Steenland K, Whelan E, Deddens J, Stayner L, Ward E. Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort study of 7576 women (United States). **Cancer Causes Control**. 2003;14(6):531–9.

59. Mikoczy Z, Tinnerberg H, Björk J, Albin M. Cancer incidence and mortality in Swedish sterilant workers exposed to ethylene oxide: updated cohort study findings 1972-2006. **Int J Environ Res Public Health**. 2011;8(6):2009–19.

60. Berrington de González A, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. **Lancet**. 2004;363(9406):345–51.

61. Hendrick RE. Radiation doses and cancer risks from breast imaging studies. **Radiology**. 2010;257(1):246–53.

62. Mathews JD, Forsythe AV, Brady Z, Butler MW, Goergen SK, Byrnes GB, et al. Cancer risk in 680 000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. **BMJ**. 2013;346:f2360.

63. Page DL, Schuyler PA, Dupont WD, Jensen RA, Plummer WD, Simpson JF. Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. **Lancet**. 2003;361(9352):125–9.

64. McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2006;15(6):1159–69.

65. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet. 2001;358(9291):1389–99.

66. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Int J Cancer**. 1997;71(5):800–9.

67. Wu Y, Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. **Breast Cancer Res Treat**. 2013;137(3):869–82.

68. Aune D, Chan DSM, Greenwood DC, Vieira AR, Rosenblatt DAN, Vieira R, et al. Dietary fiber and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Ann Oncol**. 2012;23(6):1394–402.

69. Aune D, Chan DSM, Vieira AR, Rosenblatt DAN, Vieira R, Greenwood DC, et al. Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Breast Cancer Res Treat**. 2012;134(2):479–93.

70. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Int J Cancer**. 1997 May 29;71(5):800-9.

71. Melchor L, Benítez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. **Hum Genet**. 2013;132(8):845–63.

72. Tempfer CB, Reymond MA. *Sporadic cancers*. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *The Molecular Basis of Human Cancer*. **New York: Humana Press**; 2017. p. 323-334.

73. *Somatic versus germinal mutation*. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM, editors. 7th ed. **New York: W. H. Freeman**; 2000. Available from: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21894/</u>.

74. Borch-Johnsen K, Olsen JH, Sørensen TI. Genes and family environment in familial clustering of cancer. **Theor Med**. 1994 Dec;15(4):377-86.

75. Wünsch-Filho V, Boffetta P, Colin D, Moncau JE. Familial cancer aggregation and the risk of lung cancer. **Sao Paulo Med J**. 2002 Mar 7;120(2):38-44.

76. Michailidou K, Lindström S, Dennis J, Beesley J, Hui S, Kar S, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. **Nature**. 2017 Nov 2;551(7678):92-94.

77. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol**. 2005 Jan 10;23(2):276-92.

78. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. **N Engl J Med**. 2008 Nov 13;359(20):2143-53.

79. Lynch HT, Snyder C, Lynch J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. **Ann Surg Oncol**. 2012 Jun;19(6):1723-31.

80. Heald B, Church J, Plesec T, Burke CA. fd Detecting and managing hereditary colorectal cancer syndromes in your practice. **Cleve Clin J Med**. 2012 Nov;79(11):787-96.

81. Thompson & Thompson Genética Médica. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editores. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

82. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of earlyonset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**. 1990 Dec 21;250(4988):1684-9.

83. Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, Watson P, Conway T, Lynch J, et al. Familial breastovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. **Lancet**. 1991 Jul 13;338(8759):82-3.

84. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**. 1994 Oct 7;266(5182):66-71.

85. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**. 1994 Sep 30;265(5181):2088-90.

86. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92.

87. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **Am J Hum Genet**. 1995 Jan; 56(1): 265–271.

88. Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. **Am J Hum Genet**. 1995 Dec;57(6):1457-62.

89. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. **Oncogene**. 2006 Sep 25;25(43):5898-905.

90. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. **Science**. 2014 Mar 28;343(6178):1466-70.

91. Børresen AL, Andersen TI, Garber J, Barbier-Piraux N, Thorlacius S, Eyfjörd J, et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. **Cancer Res**. 1992 Jun 1;52(11):3234-6.

92. Chen J, Lindblom P, Lindblom A. A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families. **Hum Genet**. 1998 Jan;102(1):124-5.

93. Leggett BA, Young JP, Barker M. Peutz-Jeghers syndrome: genetic screening. **Expert Rev Anticancer Ther**. 2003 Aug;3(4):518-24.

94. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C; International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Gastroenterology**. 2001 Dec;121(6):1348-53.

95. Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, Balasubramanian S, Reed MW, Pooley KA, et al. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. **Nat Genet**. 2007 Mar;39(3):352-8.

96. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**. 2007 Jun 28;447(7148):1087-93.

97. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Rafnar T, Gudmundsson J, Gudjonsson SA, Masson G, et al. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. **Nat Genet**. 2007 Jul;39(7):865-9.

98. Lee JY, Kim J, Kim SW, Park SK, Ahn SH, Lee MH, et al. BRCA1/2-negative, high-risk breast cancers (BRCAX) for Asian women: genetic susceptibility loci and their potential impacts. **Sci Rep**. 2018 Oct 15;8(1):15263.

99. Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2004;9(3):221–36.

100. MacDonald DJ. Germline mutations in cancer susceptibility genes: an overview for nurses. **Semin Oncol Nurs**. 2011;27(1):21–33.

101. ASCO Subcommittee on Genetic Testing for Cancer Susceptibility (1996) Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic testing for cancer susceptibility. **J Clin Oncol**. 1996 May;14(5):1730-6.

102. NCCN GUIDELINES FOR DETECTION, PREVENTION, & RISK REDUCTION - Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. National Comprehensive Cancer Network. [Internet] Washington: NCCN; 2015 [cited 2019 Oct 9]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.

103. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. *BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews[®] [Internet]. Seattle: University of Washigton; 2016 [cited 2019 Oct 9]; Available from: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/</u>.

104. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet. 1994 Mar 19;343(8899):692-5.

105. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. **Am J Hum Genet**. 1998 Mar;62(3):676-89.

106. Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, et al. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2001 May;10(5):467-73.

107. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **Am J Hum Genet**. 2003 May;72(5):1117-30.

108. Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. J Clin Oncol. 2006 Feb 20;24(6):863-71.

109. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA. 2017 Jun 20;317(23):2402-2416.

110. Graeser MK, Engel C, Rhiem K, Gadzicki D, Bick U, Kast K, et al. Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. J Clin Oncol. 2009 Dec 10;27(35):5887-92.

111. Malone KE, Begg CB, Haile RW, Borg A, Concannon P, Tellhed L, et al. Population-based study of the risk of second primary contralateral breast cancer associated with carrying a mutation in BRCA1 or BRCA2. J Clin Oncol. 2010 May 10;28(14):2404-10.

112. Metcalfe K, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Kim-Sing C, Olopade OI, et al. Risk of ipsilateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Res Treat**. 2011 May;127(1):287-96.

113. Metcalfe K, Gershman S, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, et al. Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Br J Cancer**. 2011 Apr 26;104(9):1384-92.

114. Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. J Natl Cancer Inst. 2013 Jun 5;105(11):812-22.

115. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **Am J Hum Genet**. 1995 Jan;56(1):265-71.
116. Satagopan JM, Boyd J, Kauff ND, Robson M, Scheuer L, Narod S, et al. Ovarian cancer risk in Ashkenazi Jewish carrier of BRCA1 and BRCA2 mutations. **Clin Cancer Res**. 2002 Dec;8(12):3776-81.

117. Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 2007 Dec 5;99(23):1811-4.

118. Evans DG, Susnerwala I, Dawson J, Woodward E, Maher ER, Lalloo F. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. **J Med Genet**. 2010 Oct;47(10):710-1.

119. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 1999 Aug 4;91(15):1310-6.

120. Kote-Jarai Z, Leongamornlert D, Saunders E, Tymrakiewicz M, Castro E, Mahmud N, et al. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. **Br J Cancer**. 2011 Oct 11;105(8):1230-4.

121. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. **Br J Cancer**. 2012 May 8;106(10):1697-701.

122. Gallagher DJ, Gaudet MM, Pal P, Kirchhoff T, Balistreri L, Vora K, et al. Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. **Clin Cancer Res**. 2010 Apr 1;16(7):2115-21.

123. Thorne H, Willems AJ, Niedermayr E, Hoh IM, Li J, Clouston D, et al. Decreased prostate cancer-specific survival of men with BRCA2 mutations from multiple breast cancer families. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2011 Jul;4(7):1002-10.

124. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrió D, Barroso A, et al. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Clin Cancer Res**. 2003 Sep 1;9(10 Pt 1):3606-14.

125. Vargas AC, Reis-Filho JS, Lakhani SR. Phenotype-genotype correlation in familial breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011 Apr;16(1):27-40.

126. Stratton MR. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. **Lancet**. 1997 May 24;349(9064):1505-10.

127. Lakhani SR1, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. **J Natl Cancer Inst**. 1998 Aug 5;90(15):1138-45.

128. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2012 Jan;21(1):134-47.

129. Spurdle AB, Couch FJ, Parsons MT, McGuffog L, Barrowdale D, Bolla MK, et al. Refined histopathological predictors of BRCA1 and BRCA2 mutation status: a large-scale analysis of breast cancer characteristics from the BCAC, CIMBA, and ENIGMA consortia. **Breast Cancer Res**. 2014 Dec 23;16(6):3419.

130. Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. **Cancer Res**. 2001 May 15;61(10):4092-7.

131. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. J Clin Oncol. 2002 May 1;20(9):2310-8.

132. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2003 Oct 1;95(19):1482-5.

133. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Diez O, Rivas C, Benítez J. Re: Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2004 May 5;96(9):712-4; author reply 714.

134. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**. 2004 Aug 15;10(16):5367-74.

135. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **J Natl Cancer Inst**. 2000 Apr 5;92(7):564-9.

136. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene**. 2007 Mar 29;26(14):2126-32.

137. Bane AL, Pinnaduwage D, Colby S, Reedijk M, Egan SE, Bull SB, et al. Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors. **Breast Cancer Res Treat**. 2009 Sep;117(1):183-91.

138. Balleine RL, Provan PJ, Pupo GM, Pathmanathan N, Cummings M, Farshid G, et al. Familial concordance of breast cancer pathology as an indicator of genotype in multiple-case families. **Genes Chromosomes Cancer**. 2010 Dec;49(12):1082-94.

139. Honrado E, Osorio A, Milne RL, Paz MF, Melchor L, Cascón A, et al. Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCAX families. **Mod Pathol**. 2007 Dec;20(12):1298-306.

140. Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, Sloane JP, Anderson TJ, van de Vijver MJ, et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. **Clin Cancer Res**. 2000 Mar;6(3):782-9.

141. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. **Genome Res**. 1996 Nov;6(11):1029-49.

142. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovska A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. J Cancer. 2019 May 14;10(9):2109-2127.

143. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer**. 2011 Dec 23;12(1):68-78.

144. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nat Genet**. 1996 Dec;14(4):430-40.

145. Ruffner H, Joazeiro CA, Hemmati D, Hunter T, Verma IM. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Apr 24;98(9):5134-9.

146. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. **J Biol Chem**. 2001 May 4;276(18):14537-40.

147. Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2010 Feb;11(2):138-48.

148. Jiang Q, Greenberg RA. Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network. **J Biol Chem**. 2015 Jul 17;290(29):17724-32.

149. Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. **J Biol Chem**. 1996 Dec 20;271(51):32863-8.

150. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. **Mol Cell**. 2006 Jun 23;22(6):719-29.

151. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. **Science**. 2002 Sep 13;297(5588):1837-48.

152. Yang H, Li Q, Fan J, Holloman WK, Pavletich NP. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. **Nature**. 2005 Feb 10;433(7026):653-7.

153. Li J, Zou C, Bai Y, Wazer DE, Band V, Gao Q. DSS1 is required for the stability of BRCA2. **Oncogene**. 2006 Feb 23;25(8):1186-94.

154. Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, et al. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. **Nature**. 2002 Nov 21;420(6913):287-93.

155. Yano K, Morotomi K, Saito H, Kato M, Matsuo F, Miki Y. Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. **Biochem Biophys Res Commun**. 2000 Apr 2;270(1):171-5.

156. Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. **EMBO Rep**. 2009 Sep;10(9):990-6.

157. Thacker J. *Homologous Recombination Repair*. In: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer*. **Berlim: Springer**; 2011. P. 1725-1729.

158. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. **Science**. 2007 May 25;316(5828):1194-8.

159. Yun MH, Hiom K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. **Nature**. 2009 May 21;459(7245):460-3.

160. Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNAdamage response. **Curr Biol**. 2009 Mar 24;19(6):524-9.

161. Sy SM, Huen MS, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Apr 28;106(17):7155-60.

162. Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. **Nucleic Acids Res**. 2006 Mar 6;34(5):1416-26.

163. Rosen EM, Fan S, Ma Y. BRCA1 regulation of transcription. Cancer Lett. 2006 May 18;236(2):175-85.

164. Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, et al. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. **Science**. 1999 Jul 30;285(5428):747-50.

165. Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. **Cancer Res**. 1999 Aug 1;59(15):3547-51.

166. Snouwaert JN, Gowen LC, Latour AM, Mohn AR, Xiao A, DiBiase L, et al. BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. **Oncogene**. 1999 Dec 20;18(55):7900-7.

167. Deng CX, Scott F. Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. **Oncogene**. 2000 Feb 21;19(8):1059-64.

168. Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. **Mol Cell**. 2001 Feb;7(2):263-72.

169. Evers B, Jonkers J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects. **Oncogene**. 2006 Sep 25;25(43):5885-97.

170. Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, et al. The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. **Cell**. 1996 Jun 28;85(7):1009-23.

171. Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. **Nature**. 1997 Apr 24;386(6627):804-10.

172. Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. **Genes Dev**. 1997 May 15;11(10):1226-41.

173. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, Vakili-Azghandi M, Avan A, Sandry R, et al. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. J Cell Physiol. 2019 May;234(5):5741-5750.

174. Szabo C, Masiello A, Ryan JF, Brody LC. The breast cancer information core: database design, structure, and scope. **Hum Mutat**. 2000;16(2):123-31.

175. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. **Nucleic Acids Res**. 2018 Jan 4;46(D1):D1062-D1067.

176. Landrum MJ, Kattman BL. ClinVar at five years: Delivering on the promise. **Hum Mutat**. 2018 Nov;39(11):1623-1630.

177. Cline MS, Liao RG, Parsons MT, Paten B, Alquaddoomi F, Antoniou A, et al. BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. **PLoS Genet**. 2018 Dec 26;14(12):e1007752.

178. Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. **Hum Mutat**. 2005 May;25(5):415-22.

179. Ferla R, Calò V, Cascio S, Rinaldi G, Badalamenti G, Carreca I, et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. **Ann Oncol**. 2007 Jun;18 Suppl 6:vi93-8.

180. Kooshyar MM, Nassiri M, Mahdavi M, Doosti M, Parizadeh A. Identification of germline BRCA1 mutations among breast cancer families in Northeastern Iran. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2013;14(7):4339-45.

181. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. **Cancer Res**. 1996 Aug 15;56(16):3663-5.

182. Johannesdottir G, Gudmundsson J, Bergthorsson JT, Arason A, Agnarsson BA, Eiriksdottir G, et al. High prevalence of the 999del5 mutation in icelandic breast and ovarian cancer patients. **Nat Genet**. 1996 May;13(1):117-9.

183. National Society of Genetic Counselors' Definition Task Force1, Resta R, Biesecker BB, Bennett RL, Blum S, Hahn SE, et al. A new definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. **J Genet Couns**. 2006 Apr;15(2):77-83.

184. *Rede Nacional de Câncer Familial – Manual Operacional*. Instituto Nacional do Câncer. [Internet] Rio de Janeiro: INCA; 2009 [cited 2019 Oct 13]. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/rede_nacional_cancer_manual.pdf.

185. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. **Nat Rev Clin Oncol**. 2010;7(12):702–7.

186. Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, et al. Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting. **Hum Mutat**. 2013 Apr;34(4):629-35.

187. Toland AE, Forman A, Couch FJ, Culver JO, Eccles DM, Foulkes WD, et al. Clinical testing of BRCA1 and BRCA2: a worldwide snapshot of technological practices. **NPJ Genom Med**. 2018 Feb 15;3:7.

188. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. **JAMA**. 2006 Mar 22;295(12):1379-88.

189. Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL, et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 2001 Nov 7;93(21):1633-7.

190. Mella S, Muzzatti B1, Dolcetti R2, Annunziata MA. Emotional impact on the results of BRCA1 and BRCA2 genetic test: an observational retrospective study. **Hered Cancer Clin Pract**. 2017 Oct 2;15:16.

191. Tung NM, Garber JE. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. **Br J Cancer**. 2018 Jul;119(2):141-152.

192. Domchek SM, Eisen A, Calzone K, Stopfer J, Blackwood A, Weber BL. Application of breast cancer risk prediction models in clinical practice. **J Clin Oncol**. 2003 Feb 15;21(4):593-601.

193. Cintolo-Gonzalez JA, Braun D, Blackford AL, Mazzola E, Acar A, Plichta JK, et al. Breast cancer risk models: a comprehensive overview of existing models, validation, and clinical applications. **Breast Cancer Res Treat**. 2017 Jul;164(2):263-284.

194. Paquin M, Fasolino T, Steck MB. Breast Cancer Risk Prediction Models: Challenges in Clinical Application. **Clin J Oncol Nurs**. 2019 Jun 1;23(3):256-259.

195. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. **J Natl Cancer Inst**. 1989 Dec 20;81(24):1879-86.

196. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. **Cancer**. 1994 Feb 1;73(3):643-51.

197. Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. **Oncologist**. 2004;9(1):13-24.

198. Parmigiani G, Berry D, Aguilar O. Determining carrier probabilities for breast cancersusceptibility genes BRCA1 and BRCA2. **Am J Hum Genet**. 1998 Jan;62(1):145-58.

199. Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P, Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. **Br J Cancer**. 2004 Oct 18;91(8):1580-90.

200. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. **J Clin Oncol**. 2002 Mar 15;20(6):1480-90.

201. Lindor NM, Johnson KJ, Harvey H, Shane Pankratz V, Domchek SM, Hunt K, et al. Predicting BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: comparison of PENN II model to previous study. **Fam Cancer**. 2010 Dec;9(4):495-502.

202. Evans DG, Eccles DM, Rahman N, Young K, Bulman M, Amir E, et al. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. J Med Genet. 2004 Jun;41(6):474-80.

203. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. **Stat Med**. 2004 Apr 15;23(7):1111-30.

204. Eisen A, Lubinski J, Klijn J, Moller P, Lynch HT, Offit K, et al. Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. J Clin Oncol. 2005 Oct 20;23(30):7491-6.

205. Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, et al. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. **JAMA**. 2006 Jul 12;296(2):185-92.

206. Katki HA. Incorporating medical interventions into carrier probability estimation for genetic counseling. **BMC Med Genet**. 2007 Mar 22;8:13.

207. Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, Gambol PJ, Culver JO, Blazer KR, et al. Limited Family structure and BRCA gene mutation status in singles cases of breast cancer. **JAMA**. 2007 Jun 20;297(23):2587-95.

208. Brozek I, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, et al. Limited significance of family history for presence of BRCA1 gene mutation in Polish breast and ovarian cancer cases. **Fam Cancer**. 2012 Sep;11(3):351-4

209. Barcenas CH, Hosain GM, Arun B, Zong J, Zhou X, Chen J, et al. Assessing BRCA carrier probabilities in extended families. J Clin Oncol. 2006 Jan 20;24(3):354-60.

210. Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R, et al. Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. **J Med Genet**. 2008 Jul;45(7):425-31.

211. Rao NY, Hu Z, Yu JM, Li WF, Zhang B, Su FX, et al. Evaluating the performance of models for predicting the BRCA germline mutations in Han Chinese familial breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**. 2009 Aug;116(3):563-70.

212. Kang E, Park SK, Yang JJ, Park B, Lee MH, Lee JW, et al. Accuracy of BRCA1/2 mutation prediction models in Korean breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**. 2012 Aug;134(3):1189-97.

213. Fischer C1, Kuchenbäcker K, Engel C, Zachariae S, Rhiem K, Meindl A, et al. Evaluating the performance of the breast cancer genetic risk models BOADICEA, IBIS, BRCAPRO and Claus for predicting BRCA1/2 mutation carrier probabilities: a study based on 7352 families from the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium. **J Med Genet**. 2013 Jun;50(6):360-7.

214. De Leeneer K, Coene I, Crombez B, Simkens J, Van den Broecke R, Bols A, et al. Prevalence of BRCA1/2 mutations in sporadic breast/ovarian cancer patients and identification of a novel de novo BRCA1 mutation in a patient diagnosed with late onset breast and ovarian cancer: implications for genetic testing. **Breast Cancer Res Treat**. 2012 Feb;132(1):87-95.

215. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 2012 Oct 4;490(7418):61-70.

216. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

217. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**. 2004 Oct 21;431(7011):931-45.

218. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. **Eur J Hum Genet**. 2005 Aug;13(8):894-7.

219. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature.** 2012 Sep 6;489(7414):57-74.

220. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**. 2004 Jul;5(7):522-31.

221. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. Hum Mol Genet. 2006 Apr 15;15 Spec No 1:R17-29.

222. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. **Nat Rev Genet**. 2011 Nov 18;12(12):861-74.

223. Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. **Nature**. 2012 Feb 15;482(7385):339-46.

224. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. **Physiol Rev**. 2011 Jul;91(3):827-87.

225. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy.** 2016 Jan 28;1:15004.

226. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel J-P. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. Front Biosci (Landmark Ed). 2012 Jun 1;17:2508-40.

227. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

228. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. **Cell.** 1993 Dec 3;75(5):855-62.

229. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. **Nature**. 2000 Feb 24;403(6772):901-6. 230. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature.** 2000 Nov 2;408(6808):86-9.

231. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.

232. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science. 2001 Oct 26;294(5543):858-62.
233. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science. 2001 Oct 26;294(5543):862-4.

234. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Res**. 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162.

235. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol. 2010 Mar;222(3):540-5.

236. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell.** 2004 Jan 23;116(2):281-97.

237. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**. 2004 Nov 11;432(7014):235-40.

238. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature.** 2003 Sep 25;425(6956):415-9.

239. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell.** 2006 Jun 2;125(5):887-901.

240. Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. **Mol Cell.** 2007 Oct 26;28(2):328-36.

241. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. **Cell.** 2007 Jul 13;130(1):89-100.

242. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature**. 2007 Jul 5;448(7149):83-6.

243. Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS, et al. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. **Nucleic Acids Res**. 2007 Jul 5;448(7149):83-6.

244. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**. 2004 Jan 2;303(5654):95-8.

245. Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. **J Cell Biol**. 2002 Jan 7;156(1):53-64.

246. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. **Nucleic Acids Res**. 2004 Sep 8;32(16):4776-85.

247. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. **EMBO J**. 2002 Nov 1;21(21):5875-85.

248. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. **Cell.** 2004 Jul 9;118(1):57-68.

249. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**. 2005 Aug 4;436(7051):740-4.

250. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**. 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.

251. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. **Mol Cell**. 2004 Jul 23;15(2):185-97.

252. Ding XC, Weiler J, Grosshans H. Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. **Trends Biotechnol**. 2009 Jan;27(1):27-36.

253. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet.** 2008 Feb;9(2):102-14.

254. Pereira TC, Alves CS, Silva GFF, Ortiz-Morea FA, Nogueira, FTS. *Mecanismos de ação de microRNAs*. In: Loreto, ELS, editor. *Introdução o mundo dos microRNAs*. **Ribeirão Preto:** Editora Cubo; 2015. Cap. 5, p. 95-105.

255. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**. 2005 Mar;3(3):e85.

256. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**. 2005 Jan 14;120(1):15-20.

257. Calin GA, Liu C-G, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004 Aug 10;101(32):11755-60.

258. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**. 2005 Feb 17;433(7027):769-73.

259. Koturbash I, Zemp FJ, Pogribny I, Kovalchuk O. Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. **Mutat Res**. 2011 Jun 17;722(2):94-105.

260. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Aug;14(8):475-88.

261. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**. 2007 Dec 21;318(5858):1931-4.

262. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Mol Cell**. 2008 May 23;30(4):460-71.

263. Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. **RNA**. 2014 Dec;20(12):1878-89.

264. Place RF, Li L-C, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008 Feb 5;105(5):1608-13.

265. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**. 2009 Jan;19(1):92-105.

266. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. Avicenna J Med Biotechnol. 2010 Oct;2(4):161-79.

267. Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in Common Human Diseases. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**. 2012 Oct;10(5):246-53.

268. Tüfekci KU, Oner MG, Meuwissen RLJ, Genç S. The role of microRNAs in human diseases. **Methods Mol Biol**. 2014;1107:33-50.

269. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.

270. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. **Nature**. 2005 Jun 9;435(7043):839-43.

271. Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. **Cell Cycle**. 2006 Oct;5(19):2220-2.

272. Chang T-C, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. **Mol Cell**. 2007 Jun 8;26(5):745-52

273. Kulshreshtha R, Ferracin M, Negrini M, Calin GA, Davuluri RV, Ivan M. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. **Cell Cycle**. 2007 Jun 15;6(12):1426-31.

274. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. **Cancer Res**. 2007 Feb 15;67(4):1424-9.

275. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature**. 2007 Oct 11;449(7163):682-8.

276. Melo SA, Moutinho C, Ropero S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R, et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. **Cancer Cell.** 2010 Oct 19;18(4):303-15.

277. Sand M, Gambichler T, Skrygan M, Sand D, Scola N, Altmeyer P, et al. Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and dicer in epithelial skin cancer. **Cancer Invest**. 2010 Jul;28(6):649-53.

278. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

279. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**. 2005 Oct 27;353(17):1793-801.

280. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

281. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008 Apr 1;105(13):5166-71.

282. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The Role of MicroRNAs in Cancer. **Yale J Biol Med**. 2006 Dec;79(3-4):131-40.

283. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA—implications for cancer. **Virchows Arch**. 2008 Jan;452(1):1-10.

284. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. **Molecular Oncology**. 2012 Dec;6(6):590-610.

285. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**. 2006 Apr;6(4):259-69.

286. Goga A, Benz C. Anti-oncomir suppression of tumor phenotypes. **Mol Interv**. 2007 Aug;7(4):199-202, 180.

287. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. Molecular Oncology. 2012 Apr;6(2):140-6.

288. Delgado MD, León J. Gene expression regulation and cancer. **Clin Transl Oncol**. 2006 Nov;8(11):780-7.

289. Haller AC, Kanakapalli D, Walter R, Alhasan S, Eliason JF, Everson RB. Transcriptional profiling of degraded RNA in cryopreserved and fixed tissue samples obtained at autopsy. **BMC Clin Pathol**. 2006 Dec 4;6:9.

290. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006 Nov;6(11):857-66.

291. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. **BMC Genomics**. 2007 Jun 12;8:166.

292. 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.

293. Tam W. The Emergent Role of MicroRNAs in Molecular Diagnostics of Cancer. J Mol Diagn. 2008 Sep;10(5):411-4.

294. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. **Biomed Res Int**. 2015;2015:125094.

295. 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.

296. 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 USA**. 2006 Feb 14;103(7):2257-61.

297. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. **Int J Cancer**. 2013 Apr 1;132(7):1602-12.

298. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008 Jul 29;105(30):10513-8.

299. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, et al. Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. **Br J Cancer**. 2012 Aug 7;107(4):684-94.

300. Erbes T, Hirschfeld M, Rücker G, Jaeger M, Boas J, Iborra S, et al. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. **BMC Cancer**. 2015 Mar 28;15:193.

301. Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CPH, Ma ESK, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. **PLoS ONE**. 2013;8(1):e53141

302. Wang F, Hou J, Jin W, Li J, Yue Y, Jin H, et al. Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: a meta-analysis. **Molecules.** 2014 May 16;19(5):6282-93.

303. Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012 Feb 21;109(8):3024-9.

304. 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.

305. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. **Mol Cancer**. 2006 Jun 19;5:24.

306. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2009;11(3):R27.

307. 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.

308. de Rinaldis E, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, et al. Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. **BMC Genomics**. 2013 Sep 23;14:643.

309. Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. **Nature.** 2013 May 16;497(7449):378-82.

310. van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Res.** 2015 Feb 18;17:21.

311. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. **Theranostics.** 2015 Jul 13;5(10):1122-43.

312. Graveel CR, Calderone HM, Westerhuis JJ, Winn ME, Sempere LF. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. **Breast Cancer (Dove Med Press)**. 2015 Feb 23;7:59-79.

313. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. **N Engl J Med**. 2001 Feb 22;344(8):539-48.

314. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.

315. Bane AL, Pinnaduwage D, Colby S, Reedijk M, Egan SE, Bull SB, et al. Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors. **Breast Cancer Res Treat**. 2009 Sep;117(1):183-91.

316. Carraro DM, Koike Folgueira MAA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi AC, de Carvalho AF, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS ONE**. 2013;8(3):e57581.

317. Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andrés R, Márquez-Rodas I, Osorio A, et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. **PLoS ONE**. 2012;7(6):e38847.

318. Vos S, Vesuna F, Raman V, van Diest PJ, van der Groep P. miRNA expression patterns in normal breast tissue and invasive breast cancers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers. Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):32115-37.

319. Murria Estal R, Palanca Suela S, de Juan Jiménez I, Egoavil Rojas C, García-Casado Z, Juan Fita MJ, et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. 2013 Nov;142(1):19-30.

320. Tanic M, Yanowski K, Gómez-López G, Rodriguez-Pinilla MS, Marquez-Rodas I, Osorio A, et al. MicroRNA expression signatures for the prediction of BRCA1/2 mutation-associated hereditary breast cancer in paraffin-embedded formalin-fixed breast tumors. **Int J Cancer**. 2015 Feb 1;136(3):593-602.

321. Fernandes CF. Identificação de mulheres em risco para câncer de mama hereditário por mutação nos genes BRCA1 e BRCA2: contribuição dos dados patológicos, história familiar e modificadores genéticos do risco de câncer. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Fundação Pio XII; 2015.

322. Palmero EI, Galvão HCR, Fernandes GC, de Paula AE, Oliveira JC, Souza CP, et al. Oncogenetics service and the Brazilian public health system: the experience of a reference Cancer Hospital. **Genet Mol Biol**. 2016 May 13;39(2):168-77.

323. Evans D, Lalloo F, Wallace A, Rahman N. Update on the Manchester Scoring System for BRCA1 and BRCA2 testing. **J Med Genet**. 2005 Jul;42(7):e39.

324. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**. 2002 Sep;41(3A):151-2, discussion 152-3.

325. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**. 2010 Jun;17(6):1471-4.

326. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. **Ann Oncol**. 2013 Sep;24(9):2206-23.

327. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Oncol Pract**. 2010 Jul;6(4):195-7.

328. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. **J Natl Cancer Inst**. 2011 Nov 16;103(22):1656-64.

329. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth fator receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013.

330. Gene Expression Data Analysis Guidelines. [Internet] Seattle: NanoString Technologies;2017[cited2019Oct19];Availablefrom:https://www.nanostring.com/downloadfile/view/251/3842.

331. Waggot D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data. **Bioinformatics**. 2012 Jun 1;28(11):1546-8.

332. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay, M. et al. miRDIP 4.1integrative database of human microRNA target predictions. **Nucleic Acids Res**. 2012 Jun 1;28(11):1546-8.

333. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**. 2003 Nov;13(11):2498-504.

334. Wu G, Dawson E, Duong A, Haw R, Stein L. ReactomeFIViz: a Cytoscape app for pathway and network-based data analysis. **F1000Res**. F1000Res. 2014 Jul 1 [revised 2014 Sep 12];3:146.

335. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Nat Rev Cancer**. 2004 Feb;4(2):153-8.

336. Søkilde R, Persson H, Ehinger A, Pirona AC, Fernö M, Hegardt C, Larsson C, Loman N, et al. Refinement of breast cancer molecular classification by miRNA expression profiles. <u>BMC Genomics.</u> 2019 Jun 17;20(1):503.

337. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. **RNA**. 2008 Nov;14(11):2348-60.

338. Weber F, Shen L, Fukino K, Patocs A, Mutter GL, Caldes T, et al. Total-genome analysis of BRCA1/2-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation. **Am J Hum Genet**. 2006 Jun;78(6):961-72.

339. Danforth DN Jr. Genomic Changes in Normal Breast Tissue in Women at Normal Risk or at High Risk for Breast Cancer. **Breast Cancer (Auckl)**. 2016 Aug 17;10:109-46.

340. Du WW, Fang L, Li M, Yang X, Liang Y, Peng C, et al. MicroRNA miR-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting PTPN9 and PTPRF to promote EGF signaling. J Cell Sci. 2013 Mar 15;126(Pt 6):1440-53.

341. Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF- β induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. **PLoS One**. 2012;7(1):e31032.

342. Khodadadi-Jamayran A, Akgol-Oksuz B, Afanasyeva Y, Heguy A, Thompson M, Ray K, et al. Prognostic role of elevated mir-24-3p in breast cancer and its association with the metastatic process. **Oncotarget**. 2018 Feb 5;9(16):12868-12878.

343. Sun Z, Asmann YW, Kalari KR, Bot B, Eckel-Passow JE, Baker TR, et al. Integrated analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing. **PLoS One**. 2011 Feb 25;6(2):e17490.

344. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordonez B, et al. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. **BMC Biotechnol**. 2011 May 9;11:46.

345. Northcott PA, Shih DJ, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. **Acta Neuropathol**. 2012 Apr;123(4):615-26.

346. De Leeneer K, Coene I, Crombez B, Simkens J, Van den Broecke R, Bols A, et al. Prevalence of BRCA1/2 mutations in sporadic breast/ovarian cancer patients and identification of a novel de novo BRCA1 mutation in a patient diagnosed with late onset breast and ovarian cancer: implications for genetic testing. **Breast Cancer Res Treat**. 2012; 132(1): 87-95.

347. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. **Endocr Relat Cancer**. 2003 Mar;10(1):1-21.

348. García-Aranda M, Redondo M. Protein Kinase Targets in Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2017 Nov 27;18(12).

349. Hedenfalk I, Ringner M, Ben-Dor A, Yakhini Z, Chen Y, Chebil G, et al. Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Mar 4;100(5):2532-7.

350. Fernández-Ramires R, Gómez G, Muñoz-Repeto I, de Cecco L, Llort G, Cazorla A, et al. Transcriptional characteristics of familial non-BRCA1/BRCA2 breast tumors. **Int J Cancer**. 2011 Jun 1;128(11):2635-44.

351. Tanic M, Andrés E, Rodriguez-Pinilla SM, Marquez-Rodas I, Cebollero-Presmanes M, Fernandez V, et al. MicroRNA-based molecular classification of non-BRCA1/2 hereditary breast tumours. **Br J Cancer**. 2013 Nov 12;109(10):2724-34.

352. Sharma VR, Gupta GK, Sharma AK, Batra N, Sharma DK, Joshi A, et al. PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation. **Curr Pharm Des**. 2017;23(11):1633-1638.

353. Hedrick SM. The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. **Nat Immunol**. 2009 Oct;10(10):1057-63.

354. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochim Biophys Acta**. 2011 Nov;1813(11):1978-86.

355. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. Biomed Res Int. 2014;2014:925350.

356. Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. **EMBO J**. 2004 Dec 8;23(24):4802-12.

357. Zhang Y, Gan B, Liu D, Paik JH. FoxO family members in cancer. **Cancer Biol Ther**. 2011 Aug 15;12(4):253-9.

ANEXOS

ANEXO A – Ficha de coleta de dados clínicos e patológicos.

Fich	Ficha 1			
AVA	LIAÇÃO DOS PAPEL DOS MICRORNAS NA PREDIÇÃO DO CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO			
Már	cia Maria Chiquitelli Marques Silveira / Danielle Pessôa Pereira			
Ider	tificação			
1	ID NAP	1		
2	Iniciais do paciente	2		
3	RH 	3		
4	Data de Nascimento DD/MM/AAAA	4	/	
5	Grupo de estudo 1- Mutação BRCA1; 2- Mutação BRCA2; 3- Controle; 99- Ignorado	5		
CAR	ACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E FATORES DE RISCO	T	1	
6	Data de admissão hospitalar DD/MM/AAAA	6	/	
7	Idade da menarca Em anos; 99- Ignorado	7		
8	Já teve alguma gravidez 0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	8		
9	Se sim, qual a idade da primeira gravidez Em anos; 99- Ignorado	9		
10	Biópsia prévia da mama 0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	10		
11	Achado de hiperplasia atípica 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	11		
12	Achado de hiperplasia lobular 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	12		
13	Número de familiares de primeiro grau com câncer de mama Número; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	13		
14	Biópsia do diagnóstico realizada no HCB? 0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	14		
15	Número do anatomopatológico da biópsia Número; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	15		

16	Data da biópsia do diagnóstico	16	/ /
	DD/MM/AAAA		
ASP	ECTOS CLINICOS E PATOLÓGICOS		
17	Câncer de mama bilateral	17	
	0- Ausente; 1- Presente; 99- Ignorado		
18	Data da cirurgia	18	/ /
	DD/MM/AAAA		
19	Tratamento cirúrgico na mama	19	
	0- Não; 1- Quadrantectomia; 2- Mastectomia; 99- Ignorado		
	Tratamento cirúrgico na axila		
20		20	
	0- Não; 1- LS; 2 - LS + Axilar; 3- Esvaziamento axilar; 99- Ignorado		
	Número de linfonodos dissecados		
21	Em números; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	21	
	Número de linfonodos positivos		
22	Em números; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	22	
22	Tipo histológico	22	
23	1- Ductal Invasivo; 2- Lobular Invasivo; 99- Ignorado	23	
24	Número do anatomopatológico da cirurgia	24	
24	888- Não se aplica; 999- Ignorado	24	
25	Grau histológico de Nottingham	25	
25	1- Grau 1; 2- Grau 2; 3- Grau 3; 99- Ignorado	25	
26	Grau nuclear	26	
	1 - Grau 1; 2 - Grau 2; 3 - Grau 3; 99 - Ignorado		
27	RE	27	
	0- Negativo; 1 - Positivo; 99 - Ignorado		
28	RP	28	
	0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado		
29	Ki67	29	
	Em %; 99- Ignorado		
	Her 2 Imunohistoquimica		
30		30	
	1- +/3; 2- ++/3; 3- +++/3; 99- Ignorado		
31	Her 2 FISH/DISH	31	
	0- Negativo; 1- Positivo; 2- ++/Não realizado; 99- Ignorado		
32	Her2 conclusão	32	
	0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado		
33	СК5/6	33	
	0 - Negativo; 1 - Positivo; 99 - Ignorado		

34	CK 14	34	
	0 - Negativo; 1 - Positivo; 99 - Ignorado		
	Subtipo molecular		
35	1- Luminal A; 2- Luminal B HER-; 3- Luminal B HER+; 4- HER superexpresso; 5- Basal-like; 6- Triplo negativo;	35	
	7 Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado		
36	рТ	36	
	0- Tis; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4; 5- T5; 99- Tx		
37	pN	37	
57	0- N0; 1- N1; 2- N2; 3- N3; 99- Nx	37	
	pM		
38	0 - M0; 1 - M1; 99 - Ignorado	38	
	Estadiamento patológico		
39	1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 99- Ignorado	39	
SEG	UNDO TUMOR PRIMARIO	<u> </u>	
40		40	
41	Iratamento cirurgico na mama	41	
	0 - Nao; 1 - Quadrantectomia; 2 - Mastectomia; 99 - Ignorado		
	Tratamento cirúrgico na axila		
42		42	
	0- Não; 1- LS; 2- LS+ Axilar; 3- Esvaziamento axilar; 99- Ignorado		
	Número de linfonodos dissecados		
43	Número; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	43	
	Número de linfonodos positivos		
44	Número; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	44	
	Tipo histológico		
45	1- Ductal Invasivo: 2- Lobular Invasivo: 99- Ignorado	45	
	Número do anatomonatológico da cirurgia		
46	Número: 888- Não se aplica: 999- Ignorado	46	
47		47	
48	Grau nuclear	48	
	1- Grau 1; 2- Grau 2; 3- Grau 3; 99- Ignorado		
49	RE	49	
	0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado		
50	RP	50	
50	0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	50	
F 4	Ki67	F 4	
51	Em %; 99- Ignorado	51	
1		1	

	Her 2 Imunohistoquimica		
52		52	
	1- +/3; 2- ++/3; 3- +++/3; 99- Ignorado		
E.2	Her 2 FISH/DISH	E 2	
55	0- Negativo; 1- Positivo; 2- ++/Não realizado; 99- Ignorado	53	
БЛ	Her2 conclusão	E A	
54	0 - Negativo; 1 - Positivo; 99 - Ignorado	54	
	CK5/6		
55	0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	55	
	СК 14		
56	0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	56	
	Subtipo molecular		
57	1- Luminal A; 2- Luminal B HER-; 3- Luminal B HER+; 4- HER superexpresso; 5- Basal-like; 6- Triplo negativo;	57	
	7 Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado		
E 9	рТ	EQ	
20	0- Tis; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4; 5- T5; 99- Tx	20	
E0	pN	E0	
35	0 - N0; 1 - N1; 2 - N2; 3 - N3; 99 - Nx	35	
60	рМ	60	
	0- M0; 1- M1; 99- Ignorado	00	
61	Estadiamento patológico	61	
01	1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 99- Ignorado	01	
QUI	MIOTERAPIA		
62	Tratamento quimioterápico	62	
02	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	02	
62	Tipo de quimioterapia	62	
05	1- Neoadjuvante; 2- Adjuvante; 99- Ignorado	05	

64	Esquema de QT 1- AC; 2- ACT; 3- CMF; 4- Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	64	
65	Se outro esquema descreva Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	65	
66	Data de início do tratamento quimioterápico DD/MM/AAAA	66	//
67	Data de término do tratamento quimioterápico DD/MM/AAAA	67	//
HOR	MONIOTERAPIA		
68	Tratamento hormonioterápico 0- Não; 1 - Sim; 99- Ignorado	68	

69	Data de início do tratamento hormonioterápico DD/MM/AAAA	69	//
70	Data de finalização do tratamento hormonioterápico DD/MM/AAAA	70	//
71	Tipo de hormonioterapia 1- TMX; 2- Anastrozol; 3- Outro; 4- Outros 88- Não se aplica; 99- Ignorado	71	
72	Se outro tipo de hormonioterapia, descreva Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	72	
TERA	PIA ALVO		
73	Trastzumab 0- Não HER+; 1- Neoadjuvante; 2- Adjuvante; 3- Não realizado; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	73	
RADI	DTERAPIA		
74	Radioterapia 0- Ausente; 1- Presente; 99- Ignorado	74	
75	Radioterapia local (plastrão) 0 - Ausente; 1 - Presente; 99- Ignorado	75	
76	Radioterapia de fossa supraclavicular 0- Ausente; 1- Presente; 99- Ignorado	76	
RECIE	DIVA	1	L
77	Recidiva local 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	77	
78	Local da recidiva local 1- Plastrão; 2- Mesma mama; 3- Esternal; 4- Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	78	
79	Recidiva locorregional 0 - Não; 1 - Sim; 99- Ignorado	79	
80	Local da recidiva locorregional 1- Fossa Supraclavicular; 2- axila homolateral; 3- axilar oposta; 4- mama oposta 5- outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	80	
81	Data da recidiva locorregional DD/MM/AAAA	81	//
82	Metástase à distância 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	82	
83	Data da recidiva à distância DD/MM/AAAA	83	//
84	Local metástase à distância – Cerebral 0- Não ; 1 - Sim; 88 - Não se aplica; 99- Ignorado	84	
85	Local metástase à distância – Hepática	85	

	0- Não 1- Sim; 88 - Não se aplica; 99- Ignorado		
86	Local metástase à distância – Óssea 0- Não 1- Sim: 88 - Não se aplica: 99- Ignorado	86	
	Local metástase à distância – Pulmonar		
87	0- Não 1- Sim; 88 - Não se aplica; 99- Ignorado	87	
	Local metástase à distância - Outras		
88	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	88	
00	Segundo tumor primário	00	
03	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	69	
00	Local segundo tumor primário	00	
90	0- Ausente; 1- Ovário; 2- Trompa de falópio; 3- Cólon/reto; 4- Pâncreas; 5- Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	50	
01	Se outro local, descreva	01	
51	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	51	
07	Estadio clínico segundo primário	07	
52	0-0; 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 88 - Não se aplica; 99- Ignorado	52	
DESF	ECHO CLÍNICO		
	Estado atual da paciente		
93	1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Óbito por CA; 4- Óbito por outra causa; 5-Óbito sem especificação;	93	
	99- Ignorado		
94	Perda de seguimento 0 - Não; 1 - Sim; 99- Ignorado	94	
95	Data da última informação (consulta ou óbito) DD/MM/AAAA	95	//
96	Data do levantamento DD/MM/AAAA	96	//

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores de invasão e metástase em pacientes com câncer de mama hereditário versus esporádico.

Pesquisador: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 45723815.6.0000.5437 Instituição Proponente: Fundação Pio XII Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.177.352 Data da Relatoria: 11/07/2015

Apresentação do Projeto:

Endereç	: Rua Antenor Duarte	Vilela, 1331		
Bairro:	Dr. Paulo Prata	CEP:	14.784-400	
UF: SP	Município:	BARRETOS		
Telefone	: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600	E-mail: cep@hcancerbarretos.ccm.br	



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores de invasão e metástase em pacientes com câncer de mama hereditário versus esporádico.

Pesquisador: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2 CAAE: 45723815.6.0000.5437 Instituição Proponente: Fundação Pio XII Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.177.352 Data da Relatoria: 11/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto retrospectivo que aborda a problemática do câncer de mama e do processo metastático, onde os pesquisadores afirmam que independentemente da origem do câncer de mama, se hereditário ou esporádico, e do subtipo molecular (se luminal, basal, com superexpressão de HER2), cerca de 90% das mortes por câncer de mama serão causadas pelo processo de metástase. Os pesquisadores apontam ainda para o fato que pesquisas recentes têm mostrado que existe uma rede de miRNAs atuando como reguladores do processo de metástase tumoral e que alguns microRNAs exerceriam um papel de biomarcadores capazes de prever o risco de desenvolver câncer de mama com um pior prognóstico. Cita-se ainda ao longo do trabalho que 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 que encontraram o miR-10b como iniciador de invasão e metástase no câncer de mama. Pouco tempo depois descobriu-se que o 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

Endereço:	Rua Antenor Duarte	Vilela, 1331		
Bairro: D	r. Paulo Prata	CEP	14.784-400	
UF: SP	Município:	BARRETOS		
Telefone:	(17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600	E-mail:	cep@hcancerbarretos.com.br

Página 01 de 05



FUNDAÇÃO PIO XII -HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores de invasão e metástase em pacientes com câncer de mama hereditário versus esporádico.

Pesquisador: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 45723815.6.0000.5437 Instituição Proponente: Fundação Pio XII Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.177.352 Data da Relatoria: 11/07/2015

Apresentação do Projeto:

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331					
Bairro: Dr. Paulo Prata	CEP:	14.784-400			
UF: SP Município	: BARRETOS				
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br			



FUNDAÇÃO PIO XII -HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores de invasão e metástase em pacientes com câncer de mama hereditário versus esporádico.

Pesquisador: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 45723815.6.0000.5437 Instituição Proponente: Fundação Pio XII Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.177.352 Data da Relatoria: 11/07/2015

Apresentação do Projeto:

Endereço:	Rua Antenor Duarte	Vilela, 1331		
Bairro: D	r. Paulo Prata	CEP:	14.784-400	
UF: SP	Município:	BARRETOS		
Telefone:	(17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600	E-mail:	cep@hcancerbarretos.com.br







PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores de invasão e metástase em pacientes com câncer de mama hereditário versus esporádico.

Pesquisador: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 45723815.6.0000.5437 Instituição Proponente: Fundação Pio XII Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.177.352 Data da Relatoria: 11/07/2015

Apresentação do Projeto:

Endereço:	Rua Antenor Duarte	Vilela, 13	331		
Bairro: D	r. Paulo Prata		CEP:	14.784-400	
UF: SP	Município:	BARRE	TOS		
Telefone:	(17)3321-0347	Fax:	(17)3321-6600	E-mail:	cep@hcancerbarretos.com.br

ANEXO C – Resultado sumarizado da pesquisa por variantes de nucleotídeo único em genes de alto risco para o câncer de mama a partir de amostra de uma paciente jovem com idade inferior a <35 anos e sem história familiar sugestiva de síndrome HBOC.

Locus	Ref.	Genótipo	Gene	Localização	Função	Alteração	ClinVAr
chr13:32899388	А	A/C	BRCA2	Intrônico	Desconhecida	c.425+67A>C	Benigna
chr13:32906480	А	A/C	BRCA2	Exônico	Missense	c.865A>C	Benigna
chr13:32906729	A	A/C	BRCA2	Exônico	Missense	c.1114A>C	Benigna: significado incerto
chr13:32906980	А	A/G	BRCA2	Exônico	Sinonímia	c.1365A>G	Benigna
chr13:32910351	G	G/T	BRCA2	Intrônico	Desconhecida	c.1910-51G>T	Benigna
chr13:32910721	Т	T/C	BRCA2	Exônico	Sinonímia	c.2229T>C	Benigna
chr13:32911463	А	A/G	BRCA2	Exônico	Missense	c.2971A>G	Benigna
chr13:32913055	А	G/G	BRCA2	Exônico	Sinonímia	c.4563A>G	Benigna
chr13:32915005	G	C/C	BRCA2	Exônico	Sinonímia	c.6513G>C	Benigna
chr13:32929387	т	C/C	BRCA2	Exônico	Missense	c.7397T>C	Benigna: significado incerto
chr13:32936646	т	T/C	BRCA2	Sítio de splicing	Desconhecida	c.7806-14T>C	Benigna
chr13:32953388	т	T/C	BRCA2	Intrônico	Desconhecida	c.8755-66T>C	Benigna
chr13·32953550	G	G/A	BRCAZ	Fxônico	Missense	د 88516>۵	Benigna: provavelmente benigna
chr17:7578115	т		TP53	Intrônico	Desconhecida	c 672+624>G	Benigna
chr17:7578645	r C	с/с	TD52	Intrônico	Desconhecida	c 376-916>A	Benigna
chr17:7579472	G	c/c	TP53	Exônico	Missense	c.215C>G	Benigna: significado incerto

Não foram evidenciadas variantes relevantes nos genes BRCA1 e PTEN.

Ref.: referência.

ANEXO D – Documento comprobatório da situação do artigo científico.

26/10/2019

Email – Danielle Pessôa – Outlook

Notification to co-authors of submission to BMC Cancer BCAN-D-19-03138

BMC Cancer Editorial Office <em@editorialmanager.com>

Ter, 01/10/2019 17:04

Para: Danielle Pessôa-Pereira <dpessoap@outlook.com>

BCAN-D-19-03138

Article miRNA expression profiling in normal breast tissues and hereditary breast tumors from BRCA1- and BRCA2-germline mutation carriers in Brazil

Danielle Pessôa-Pereira; Adriane Feijó Evangelista; Rhafaela Lima Causin; René Aloisio da Costa Vieira; Lucas Faria Abrahão Machado; lara Viana Vidigal Santana; Vinicius Duval da Silva; Karen Cristina Borba de Souza; Renato José de Oliveira-Silva; Gabriela Carvalho Fernandes; Rui Manuel Reis; Edenir Inêz Palmero; Marcia Marques

Dear author:

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to BMC Cancer. The manuscript details are below.

Title: Article miRNA expression profiling in normal breast tissues and hereditary breast tumors from BRCA1- and BRCA2-germline mutation carriers in Brazil Authors: Danielle Pessôa-Pereira; Adriane Feijó Evangelista; Rhafaela Lima Causin; René Aloisio da Costa Vieira; Lucas Faria Abrahão Machado; Iara Viana Vidigal Santana; Vinicius Duval da Silva; Karen Cristina Borba de Souza; Renato José de Oliveira-Silva; Gabriela Carvalho Fernandes; Rui Manuel Reis; Edenir Inêz Palmero; Marcia Marques Corresponding author: Dr. Marcia Marques

If you are not aware of the submission, or if you should not be listed as contributing author, please notify the Editorial Office. Contact details for the Editorial Office are available under "Contact Us" on the journal website.

Kind regards,

Editorial Office BMC Cancer https://bmccancer.biomedcentral.com/

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at https://www.springernature.com/production-privacy-policy. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

https://outlook.live.com/mail/search/id/AQQkADAwATZiZmYAZC05MzFmLWRiMmQtMDACLTAwCgAQALTSgtZRRNxJt2rG%2FD%2B3m%2BU... 1/2

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL:

https://www.editorialmanager.com/bcan/login.asp?a=r). Please contact the publication office if you have any questions.

BMC Cancer

Article miRNA expression profiling in normal breast tissues and hereditary breast tumors from BRCA1- and BRCA2-germline mutation carriers in Brazil --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BCAN-D-19-03138			
Full Title:	Article miRNA expression profiling in normal breast tissues and hereditary breast tumors from BRCA1- and BRCA2-germline mutation carriers in Brazil			
Article Type:	Research article			
Section/Category:	Biomarkers			
Funding Information:	Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention, and Education of Occupational Cancer) (X)	Dr Rui Manuel Reis		
Abstract:	MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding expression regulation and have been descr Aberrant miRNA expression has been frequ (SBC), but few studies have focused on pro- this study, we aimed to identify specific miR sporadic breast cancer (SBC) and normal b expression profiling using NanoString techn BRCA1, 14 BRCA2, and 14 BRCAX) and 2 BRCA1- and BRCA2- mutation carriers (N wild type [WT], n=3) were also included. mil profiles that were specific to HBC. We exclu associated with SBC. Twenty-five miRNAs >2.0 and p<0.05) and considered as potent in HBC (BRCA1, BRCA2, and BRCAX) com miRNA expression profiles can differentiate (BRCAX) breast cancer groups. Therefore, novel diagnostic biomarkers for the prediction	RNAs involved in post-transcriptional gene ibed as key regulators of carcinogenesis. Jently reported in sporadic breast cancers offling hereditary breast cancers (HBC). In RNA signatures in HBC compared to preast tissues (NBT). Global miRNA hology was performed on 43 HBC (15 3 SBC samples. Eight NBT samples from N-BRCA, n=5) and non-mutation carriers (N- RNA expression analysis identified several uded eight miRNAs that were also were differentially expressed (fold change: ial biomarkers (area under the curve >0.75) npared to NBT. Our results showed that HBC from sporadic and non-informative miRNA signatures can be used as potential on of BRCA1/2 mutations.		
Corresponding Author:	Marcia Marques Hospital de Amor BRAZIL			
Corresponding Author E-Mail:	mmcmsilveira@gmail.com			
Corresponding Author Secondary Information:				
Corresponding Author's Institution:	Hospital de Amor			
Corresponding Author's Secondary Institution:				
First Author:	Danielle Pessôa-Pereira			
First Author Secondary Information:				
Order of Authors:	Danielle Pessôa-Pereira			
	Adriane Feijó Evangelista			
	Rhafaela Lima Causin			
	René Aloisio da Costa Vieira			
	Lucas Faria Abrahão Machado			
	Iara Viana Vidigal Santana			
	Vinicius Duval da Silva			
	Karen Cristina Borba de Souza			

	Renato José de Oliveira-Silva		
	Gabriela Carvalho Fernandes		
	Rui Manuel Reis		
	Edenir Inêz Palmero		
	Marcia Marques		
Order of Authors Secondary Information:			
Opposed Reviewers:			
Additional Information:			
Question	Response		
Has this manuscript been submitted before to this journal or another journal in the BMC series?</a 	Yes		
Please provide the manuscript identification number from your previous submission. If you no longer have the identification number, please specify this in the text box below. br/> as	JECC-D-19-02086		

Click here to view linked References

Click here to access/download;Manuscript;Manuscript_BMC_.docx

	1	miRNA expression profiling of hereditary breast tumors from BRCA1- and BRCA2-
1 2	2	germline mutation carriers in Brazil
3 4	3	
5 6	C	
7 8	4	Danielle Pessôa-Pereira ¹ , Adriane Feijó Evangelista ¹ , Rhafaela Lima Causin ¹ , René Aloisio
9 10	5	da Costa Vieira ² , Lucas Faria Abrahão Machado ³ , Iara Viana Vidigal Santana ³ , Vinicius
11 12	6	Duval da Silva ³ , Karen Cristina Borba de Souza ¹ , Renato José de Oliveira-Silva ¹ , Gabriela
13 14	7	Carvalho Fernandes ¹ , Rui Manuel Reis ^{1,4,5} , Edenir Inêz Palmero ^{1,7,8} , and Márcia Maria
15 16	8	Chiquitelli Marques ^{*1,8}
17 18 19	9	
20 21	10	¹ Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil.
22 23	11	² Department of Breast and Reconstructive Surgery, Barretos Cancer Hospital, Barretos,
24 25 26	12	SP, Brazil.
27 28 29	13	³ Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil.
30 31	14	⁴ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Medical School, University of Minho,
32 33	15	Braga, Portugal.
34 35 36	16	⁵ ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.
37 38 20	17	⁶ Center of Molecular Diagnosis, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil.
39 40 41	18	⁷ Department of Oncogenetics, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil.
42 43 44	19	⁸ Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata – FACISB, Barretos, SP, Brazil.
45 46	20	⁹ Tumor Biobank, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil.
47 48 49	21	
50 51	22	*Correspondence: <u>mmcmsilveira@gmail.com</u>
52 53 54	23	
55 56	24	
57 58 59	25	
60 61 62 63 64 65	26	

27 ABSTRACT

Background: MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs involved in posttranscriptional gene expression regulation and have been described as key regulators of carcinogenesis. Aberrant miRNA expression has been frequently reported in sporadic breast cancers, but few studies have focused on profiling hereditary breast cancers. In this study, we aimed to identify specific miRNA signatures in hereditary breast tumors and to compare with sporadic breast cancer and normal breast tissues.

Methods: Global miRNA expression profiling using NanoString technology was performed on 43 hereditary breast tumors (15 BRCA1, 14 BRCA2, and 14 BRCAX), 23 sporadic breast tumors and 8 normal breast tissues. These normal breast tissues derived from BRCA1- and BRCA2- mutation carriers (n=5) and non-mutation carriers (n=3). Subsequently, we performed receiver operating characteristic (ROC) curve analyses to evaluate the diagnostic performance of differentially expressed miRNAs. Putative target genes of each miRNAs considered as potential biomarkers were identified using miRDIP platform and used for pathway enrichment analysis.

42 Results: miRNA expression analyses identified several profiles that were specific to 43 hereditary breast cancers. A total of 25 miRNAs were found to be differentially 44 expressed (fold change: >2.0 and p<0.05) and considered as potential biomarkers (area 45 under the curve >0.75) in hereditary breast tumors compared to normal breast tissues, 46 with an expressive upregulation among BRCAX cases. Furthermore, bioinformatic 47 analysis revealed that these miRNAs shared target genes involved in ErbB, FoxO, and 48 PI3K-Akt signaling pathways.

Conclusions: Our results showed that miRNA expression profiling can differentiate 50 hereditary from sporadic breast tumors and normal breast tissues. These miRNAs were 51 remarkably deregulated in BRCAX hereditary breast cancers. Therefore, miRNA 52 signatures can be used as potential novel diagnostic biomarkers for the prediction of 53 *BRCA1/2*- germline mutations and may be useful for future clinical management.

55 Keywords: microRNA; biomarker; NanoString; hereditary breast tumors
56 BACKGROUND

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer among women worldwide after non-melanoma skin cancer and the leading cause of cancer-related deaths in developing countries [1,2]. Although most breast tumors arise due to acquired mutations caused mainly by lifestyle and environmental factors, approximately 5% to 10% are attributable to inherited pathogenic variants in cancer-predisposing genes [3,4]. Indeed, breast tumors have been reported within the tumor spectrum of many hereditary cancer syndromes [5]. However, the most common entity linked to inherited breast cancer is the hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) predisposition syndrome, which is a highly penetrant, autosomal dominant condition primarily caused by germline pathogenic variants in breast cancer type 1 and 2 susceptibility genes (BRCA1 and BRCA2) [3-6]. Although 50% of suggested HBOC cases are of unknown genetic origin (also termed 'BRCAX'), pathogenic variants in *BRCA1/2* are more frequent (9-29%) than pathogenic variants in other high-penetrance genes (4-11%) [7,8].

BRCA1 and BRCA2 are well-known tumor suppressor genes (TSGs) involved in many cellular processes implicated in the maintenance of genome integrity. Therefore, pathogenic variants in BRCA1 or BRCA2 can disrupt important biological functions, allowing the accumulation of genetic alterations and consequently increasing cancer susceptibility [9,10]. Indeed, female individuals who carry a BRCA1/2-germline variant have a lifetime risk of developing breast cancer of up to 87% [11]. This may present a high histologic grade and, in particular for *BRCA1*-mutation carriers, a high mitotic index and triple-negative phenotype [12]. The identification of BRCA1/2-pathogenic variants is imperative and could directly impact on prevention, early cancer diagnosis, and clinical management of patients.

60 Genetic counseling and testing for *BRCA1/2*-germline mutations are currently available; however, screening of these mutations is still expensive and time-consuming because both genes do not present mutational hotspot regions; thus, such genetic alterations can occur throughout all the coding sequences [13]. Accordingly, many prediction models have been developed and are widely used to estimate the pre-test likelihood of identifying individuals and families at high risk for carrying these mutations [14-18]. Some studies that have evaluated the performance of the breast cancer genetic risk models reported low specificity rates for predicting *BRCA1/2*-germline mutations [19-22]. Therefore, there is a need to define additional parameters that could complement the current criteria adopted by the available prediction models to provide an accurate and effective selection of patients that should proceed to *BRCA1/2* genetic testing.

MicroRNA (miRNA) are small non-coding RNAs that could promote tumor development and/or progression by disturbing oncogenes and tumor suppression expression patterns [23-25]. Several studies have found distinctive miRNA expression profiles in a wide range of human tumors, suggesting that miRNA profiling could be used for diagnostic purposes [26-29]. An advantage of miRNAs is that they are more resistant to degradation caused by the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue processing [30]. However, little is known about miRNA expression in hereditary breast cancers (HBC) [31-33]. Moreover, it remains unclear whether miRNA profiling could be useful to distinguish BRCA1/2-mutation carriers from non-carriers.

In order to identify miRNA signatures that could serve as potential biomarkers to discriminate HBC, we evaluate the expression profiles of miRNAs in HBC tumors, sporadic breast cancer (SBC), and normal breast tissues (NBT) from carriers and noncarriers of BRCA1 or BRCA2 pathogenic germline mutations using NanoString technology. We demonstrate that miRNA expression profiles can discriminate HBC from SBC and BRCAX breast cancer. Therefore, these miRNAs could be useful as potential diagnostic biomarkers to improve the performance of the BRCA1/2-mutation prediction models and impact on the clinical management of breast cancer patients who may benefit from platinum-based chemotherapy and PARP inhibitors, such as olaparib [34].

111 METHODS

112 Study population and clinicopathological features

A retrospective cohort study was performed in a total of 74 unrelated female patients admitted at Barretos Cancer Hospital between 2003 and 2017, including 66 patients with primary invasive breast cancer and 8 patients attended for reasons other than personal history of malignancy. Our cohort comprised 29 HBC patients harboring a confirmed *BRCA1* (n=15) or *BRCA2* (n=14) pathogenic germline mutation (a subset of
cases derived from a larger population [35]); 14 HBC patients who did not harbor
pathogenic germline mutations in *BRCA1*, *BRCA2* or other known high-risk genes (*TP53*and *PTEN*) – therefore considered as BRCAX; 23 SBC patients with no family history of
breast and/or ovarian cancer; five healthy individuals harboring a *BRCA1* (n=3) or *BRCA2*(n=2) pathogenic germline mutation who had undergone prophylactic mastectomies;
and three healthy patients with no family history of breast and/or ovarian cancer.

All patients belonging to high-risk HBOC families were referred by the Department of Oncogenetics of Barretos Cancer Hospital for genetic testing after fulfilling the clinical criteria defined by the National Comprehensive Cancer Network for a personal and/or family history of HBOC. Healthy BRCA1/2-mutation carriers were referred after a pathogenic germline mutation was identified in their families and were invited to undergo a mutation-specific predictive genetic test. All information regarding genetic counseling, genetic testing, and the management of the families at risk for hereditary cancer in our institution have been described in detail elsewhere [36].

133 Pathological evaluation

All clinical and pathological data were collected from medical records. Histologic tumor grade was assessed by the modified Scarff-Bloom-Richardson grading system. Tumor staging was performed according to the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer TNM system. Breast cancers were also classified into three intrinsic molecular subtypes (luminal, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)+, and triple-negative) based on the combined evaluation of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression status according to the 13th St Gallen International Expert Consensus [37]. Evaluation of ER, PR, and HER2 status was done using FFPE sections as part of routine practice at the Pathology Department for breast cancer clinical assessment defined according to current guidelines [38-40].

145 Sample collection and RNA isolation

FFPE breast tissue samples were obtained from the archives at the Department of Pathology of the Barretos Cancer Hospital. FFPE samples underwent total RNA isolation using the QIASymphony SP automated system based on magnetic-bead technology (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol (RNA 130 FFPE). Quantification and RNA quality assessment were performed using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA).

153 NanoString nCounter miRNA assay

miRNA expression profiling was performed using the nCounter Human v3 miRNA Expression Assay Kit (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA), according to the manufacturer's protocol. Briefly, 100 ng of total RNA from each sample underwent sample preparation involving multiplexed annealing of specific tags onto the 3' end of each mature miRNA, followed by a ligation reaction and an enzymatic purification to remove non-ligated tags. Next, miRNAs were hybridized with probe pairs which comprised biotin-labeled capture probes and fluorescent color-barcoded reporter probes for 21 h at 65°C. For sample preparation and hybridization steps, a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to ensure the temperature control required for the enzymatic reactions. Unhybridized probes were washed away using magnetic bead-based purification on the nCounter Prep Station (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). Purified target-probe complexes were subsequently eluted from the beads and immobilized on cartridges with streptavidincovered surfaces. Finally, the cartridges were transferred into the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) for data collection consisting of digital imaging and direct quantification of the individual fluorescent barcodes.

171 NanoString data analysis

NanoString raw data were submitted to R version 3.6.1 (R Foundation, Vienna,
Austria) and analyzed using the NanoStringNorm R package (version 1.1.21) [41]. Briefly,
the following normalization steps were applied after probe-level background correction
by code-count normalization using geometric mean parameter and sample content was

normalized using the top 10 low Coefficient Vallue (CV) probes' values. Normalized data were log2-based transformed and subsequently used as input for the differential expression analyses. Statistical analysis of differential expression in R was performed using the Linear Models for Microarray Data (limma) package from Bioconductor, considering a p-value less than 0.05 and a two-fold change difference in the expression levels between the groups evaluated. The miRNAs differentially expressed were further filtered according to (i) the presence in normal vs. sporadic group comparisons, and (ii) miRNAs presenting an AUC-ROC \leq 0.75 were excluded. ROC curve analyses were performed using the ROCR R package. Heatmaps of miRNA expression were generated using the ComplexHeatmaps R package.

187 Target prediction and pathway enrichment analysis

We identified putative target genes of all differentially expressed miRNAs through the microRNA Data Integration Portal (mirDIP) (http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/), a web-based computational database that integrates dozens of bioinformatic tools for miRNA target prediction. We restricted our search by considering predicted miRNA-target interactions under very high confidence (top 1%). From the obtained gene lists, we selected targets predicted by at least three of the following five prediction tools: DIANA, microrna.org, RNA22, RNAHybrid, and TargetScan. Considering the mechanism by which miRNAs downregulate their target genes and may impact on carcinogenesis and tumor progression, we only focused on genes previously described as TSGs or oncogenes in human cancers according to the of Catalogue Somatic **Mutations** in Cancer (COSMIC) (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic). The gene lists generated after applying all these selection criteria were used as input data for further analysis in Cytoscape (version 3.6.1), software for integration, visualization, and investigation of regulatory networks (https://cytoscape.org/). To evaluate whether co-expressed miRNAs could cooperatively affect breast cancer-related biological processes and pathways, we performed Gene Ontology (GO) enrichment analysis using the ReactomeFIViz app (version 7.0.1), a Cytoscape plugin that provides networks of functional regulatory interactions and curated biological pathways derived from Reactome and other

207 databases [42]. For this purpose, only breast neoplasm-associated genes according to
208 the Cancer Gene Index Annotations provided by the National Cancer Institute were
209 selected for pathway enrichment and GO analyses through the Load Cancer Index
210 function available in ReactomeFIViz. Only the process presenting at least three genes
211 and an FDR-corrected p-value ≤0.05 was considered.

213 Statistical analysis

Patient data were presented as frequencies and percentages for qualitative
variables and mean values ± standard deviation (SD) for continuous variables. An
independent t-test was used to compare mean values and a chi-square test or Fisher's
exact test to compare frequencies. The statistical significance was based on a p-value
≤0.05. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics for Windows, version
20.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTS

MiRNA expression profiling was performed on a total of 74 FFPE samples, which comprised 43 HBC (15 BRCA1; 14 BRCA2; 14 BRCAX), 23 SBC and 8 NBT from 3 *BRCA1*mutation carriers, 2 *BRCA2*-mutation carriers and 3 non-carriers. Main demographics and clinicopathological characteristics of the population are showed in Table 1.

227 miRNA signatures of sporadic breast tumors

First, we investigated which miRNAs were significantly altered in SBC samples compared with normal tissues. We found a total of 49 miRNAs significantly upregulated (fold change values: ≥2.0; p value: <0.05) in sporadic breast tumors as compared to NBT groups, yet no downregulated miRNAs were found (Figure 1). This first analysis allowed us to identify whether any miRNAs are shared between the SBC and HBC groups.</p>

234 miRNA expression profiling of hereditary breast cancer and normal breast tissues

In order to explore whether miRNA expression profiling could also discriminate BRCA1, BRCA2, and BRCAX breast tumors, we performed an analysis of variance (ANOVA) test to identify a miRNA signature among HBC. We found a total of 73 differentially expressed miRNAs, which comprised 70 upregulated and 3 downregulated miRNAs. After a supervised hierarchical clustering analysis, we confirmed that hereditary breast tumors mainly exhibited an upregulated miRNA expression profile as compared to NBT (Figure 2). We also observed that most BRCA2 breast tumors had expression patterns similar to BRCAX, especially in the upregulated miRNAs cluster, whereas most BRCAX breast tumors exhibited a specific expression pattern in the downregulated miRNAs cluster. Interestingly, we found that some BRCA1/2-mutated NBT samples did not present homogenous expression among the NBT groups for specific miRNAs.

Finally, we verified that 8 miRNAs significantly expressed in HBC were commonly deregulated in SBC as compared to NBT (hsa-miR-627-3p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-539-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-362-3p and hsa-miR-145-5p). Therefore, those miRNAs were excluded from the subsequent analysis.

252 miRNAs as biomarkers for hereditary breast tumors

Next, we aimed to identify miRNAs that could be potential diagnostic biomarkers. We identified 25 upregulated miRNAs as potential biomarkers using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. Our results showed higher accuracy in distinguishing HBC from NBT (area under the curve [AUC] >0.75) in all groups (Table 2). We also observed that these miRNAs achieved slightly higher AUC values in BRCAX breast tumors compared to BRCA1 and BRCA2 breast tumors, suggesting that these miRNAs have higher specificity and specificity rates for hereditary BRCAX as compared to *BRCA1/2*-mutated breast tumors.

Subsequently, we generated a heatmap illustrating the expression patterns of these potential biomarkers across the samples based on a supervised hierarchical clustering analysis (Figure 3A). Even though most BRCA2 breast tumors presented similar miRNA expression profiles to BRCAX tumors as previously mentioned, we

observed that these potential biomarkers had significantly higher mean fold change
 values among BRCAX samples as compared to BRCA1 and BRCA2 breast tumors (Figure
 3B). Therefore, our findings suggest that these miRNAs could be suitable in
 discriminating hereditary BRCAX breast tumors from *BRCA1/2*-mutated breast tumors.

270 Functional in silico analysis

We further investigated the association of these 25 miRNAs with biological pathways related to carcinogenesis. Previously described genes in breast cancer, such as *TP53*, *PTEN*, and *FOXO1*, were identified as target genes in five main pathways, including ErbB and FoxO signaling, the PI3K-Akt signaling pathway, and miRNAs in cancer and breast cancer. The most significant pathways of the targets associated with breast neoplasm and those with putative roles as oncogenes and TSGs are shown in Table 3.

DISCUSSION

In the present study, miRNA expression profiles were analyzed in a series of hereditary breast tumors (BRCA1/2 and BRCAX-associated breast tumors), sporadic breast tumors and NBT from BRCA1/2-germline mutation carriers and non-carriers using NanoString nCounter Technology. Initially, we identified differentially expressed miRNAs that could determine a specific signature of SBC vs. NBT that are related to miRNAs identified in previous studies about sporadic breast tumors (i.e., hsa-miR-145-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-137, and hsa-miR-551a) [43-46]. Furthermore, this analysis was important to identify a specific miRNA signature for SBC and to investigate if any miRNAs are shared between SBC and HBC. Thus, we found eight miRNAs (hsa-miR-627-3p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-539-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-362-3p, and hsa-miR-145-5p) that were also differentially expressed in HBC. These miRNAs were used as a filter to our next analysis with hereditary breast tumors and excluded to allow that we would have a specific miRNA expression profiles of HBC.

292 We found several differentially expressed miRNAs in HBC compared to NBT with 293 an expressive signature for BRCAX breast tumors. Some of these have been previously described as deregulated in BRCA1/2-germline mutation carriers, such as hsa-miR-141-3p; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-21-5p; and hsa-miR-106b-5p [33, 47]. Those miRNAs have also been reported to be deregulated in sporadic breast tumors [33], supporting the hypothesis that some miRNAs could have a relevant role in for both sporadic and hereditary breast cancer carcinogenesis. Furthermore, some of the differentially expressed miRNAs were also found to be deregulated in some BRCA1/2-mutated NBT cases, suggesting that NBTs from healthy BRCA1/2-germline mutations carriers might display biological alterations due to genomic instability caused by impaired BRCA1 and BRCA2 functions.

We also proposed to investigate whether those differentially expressed miRNAs could be considered as potential biomarkers for discriminate patients harboring BRCA1/2-germline mutations from non-carriers. Indeed, many studies investigated the role of miRNAs as diagnostic biomarkers in SBC, but little has been reported in hereditary breast tumors. Although limited in terms of the number of specimens used for miRNA expression profiling, Murria-Estal et al. identified 15 DE miRNAs that could classify BRCA1, BRCA2, BRCAX and sporadic breast tumors with 75% accuracy. However, miRNAs validated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (miR-4417 and miR-423-3p) could only discriminate hereditary (BRCA1, BRCA2, and BRCAX) from non-hereditary breast tumors (70.1% accuracy) [31]. On the other hand, Tanic et al. established a biomarker classifier based on six miRNAs that could distinguish BRCA1/2-mutated from non-mutated breast tumors with 92% accuracy [32]. Both studies were primarily based on microarray technology for the screening of differentially expressed miRNAs, a laborious technique that requires complementary DNA (cDNA) synthetized from highly stable messenger RNAs (mRNA) – which are rarely obtained from FFPE tissues and other low-quality samples - and experimental validation by qPCR. In the present study, we assessed miRNA expression profiles in FFPE samples using NanoString technology - a high throughput, rapid, reproducible and sensitive platform for molecular quantification that does not require target sequence amplification and technical replicates [48-51]. All samples have accurate results using NanoString technology. We found 25 upregulated miRNAs that could classify HBC (especially BRCAX breast tumors) with high accuracy rates according to ROC curve analysis (AUC: ≥0.80). Because BRCAX patients have been

б

unnecessarily referred to *BRCA1/2*-germline mutation testing [19-22], we assume that
these miRNAs could identify those patients that might not benefit from genetic testing
and personalized therapies, such as platinum-based chemotherapy and PARP inhibitors
[34].

Finally, in silico pathway analysis identified several common target genes involved in breast cancer carcinogenesis of the 25 miRNAs identified as potential biomarkers for BRCA1/2-germline mutation carriers and BRCAX patients using ReactomeFIViz. These genes are associated with important pathways, including ErbB and FoxO signaling, the PI3K-Akt signaling pathway, and miRNAs in cancer and breast cancer. However, because BRCAX breast tumors were also included in the HBC group, we believe that further studies are needed to investigate target genes and signaling pathways specifically deregulated in BRCA1/2-mutated breast tumors.

338 CONCLUSIONS

In conclusion, this work provides the first evidence of a molecular profile of miRNAs that could discriminate with high accuracy *BRCA1/2*-germline mutation carriers and BRCAX from NBT in Brazilian women using NanoString technology. Furthermore, these miRNAs could have potential value as a complementary clinical diagnostic tool to identify breast cancer patients that could benefit from *BRCA1/2*-mutations genetic testing and personalized clinical management. However, further larger prospective studies are required to validate these profiles.

347 LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA: analysis of variance; AUC: area under the curve; ER: estrogen receptor; FDR: false discovery rate; FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded; HBC: hereditary breast cancer; HBOC: hereditary breast and ovarian cancer syndrome; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; miRNA: microRNA; NBT: normal breast tissue; PR: progesterone receptor; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; ROC: receiver

operating characteristic; SBC: sporadic breast cancer; TSG: tumor suppressor gene; WT: wild type. б DECLARATIONS Ethics approval and consent to participate This study was approved by the Research Ethics Committee of the Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil (950/2015) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all involved patients before data and sample collection. **Consent for publication** Not applicable. Availability of data and materials All data used and analyzed during this study are available from the corresponding author on reasonable request. **Competing interests** The authors declare no conflict of interest. Funding This research was funded by grants from the Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention, and Education of Occupational Cancer) and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Finance Code 001.

379 Authors' contributions

DPP developed, led the overall study and prepared the manuscript. AFE participated in data analysis and helped in the study design. RLC helped with the NanoString experiments. RACV provided clinical support in this study and helped in case selection. LFAM, IVVS and VDS participated in sample collection. GCF, KCBS and RJOS provided administrative and technical assistance. RMR helped in the study design, provided advice during the study development and critically reviewed the manuscript. EIP helped with case selection and critically reviewed the manuscript. MMSM conceived, provided advice during the study development and critically reviewed the manuscript.

389 Acknowledgements

We would like to thank the Department of Oncogenetics, Department of Pathology, Center of Molecular Diagnosis, and the Tumor Biobank of Barretos Cancer Hospital.

REFERENCES

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer
 incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN
 2012. Int J Cancer. 2015; 136(5): E359-86.

399 2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal, A. Global cancer
400 statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015; 65(2): 87-108.

402 3. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes.
403 Oncogene. 2004; 23(38): 6445-70.

4. Melchor L, Benítez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. Hum Genet. 2013; 132(8): 845-63. 5. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. Oncogene. 2006; 25(43): 5898-905. Couch FJ, Nathanson, KL, Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in 6. personalized cancer care and prevention. Science. 2014; 343(6178): 1466-70. Keeney MG, Couch FJ, Visscher DW, Lindor NM. Non-BRCA familial breast cancer: 7. review of reported pathology and molecular findings. Pathology. 2017; 49(4): 363-370. Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast 8. and Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2016; 374(5): 454-68. 9. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer Sci. 2004; 95(11): 866-71. 10. Roy. R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. Nat Rev Cancer. 2011; 12(1): 68-78. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The Pathology of Hereditary Breast Cancer. 11. Hered Cancer Clin Pract. 2004; 2(3): 131–138.

- 12. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. Nat Rev Clin Oncol. 2010; 7(12): 702-7. б 13. Parmigiani G, Berry D, Aguilar O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet. 1998; 62: 145-58. 14. Evans DG, Eccles DM, Rahman N, Young K, Bulman M; Amir E, et al. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. J Med Genet. 2004; 41(6): 474-80. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, et al. 15. Clinical characteristics of individual with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. J Clin Oncol. 2002; 20(6): 1480-90. 16. Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P, Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. Br J Cancer. 2004; 91(8): 1580-90. 17. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. Stat Med. 2004; 23(7): 1111-30. 18. Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, Gambol PJ, Culver JO, Blazer KR, et al. Limited Family structure and BRCA gene mutation status in singles cases of breast cancer. JAMA. 2007; 297(23): 2587-95. Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R, et al. Predicting 19. the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA,

BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics
clinics. J Med Genet. 2008; 45(7); 425-31.

Rao NY, Hu Z, Yu JM, Li WF, Zhang B, Su FX, et al. Evaluating the performance of
models for predicting the BRCA germline mutations in Han Chinese familial breast cancer
patients. Breast Cancer Res Treat. 2009; 116(3): 563-70.

463 21. Kang E, Park SK, Yang JJ, Park B, Lee MH, Lee JW, et al. Accuracy of BRCA1/2
464 mutation prediction models in Korean breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat.
465 2012; 134(3): 1189-97.

Fischer C, Kuchenbäcker K, Engel C, Zachariae S, Rhiem K, Meindl A, et al.
Evaluating the performance of the breast cancer genetic risk models BOADICEA, IBIS,
BRCAPRO and Claus for predicting BRCA1/2 mutation carrier probabilities: a study based
on 7352 families from the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium. J
Med Genet. 2013; 50(6): 360-7.

473 23. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell.
474 2004; 116(2): 281-97.

476 24. Goga A, Benz C. Anti-oncomir suppression of tumor phenotypes. Mol Interv.
477 2007; 7(4): 199-202.

479 25. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications,
480 and next frontiers. Mutat Res. 2011;717(1-2):1-8.

26. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 2005; 435(7043): 834-838. 27. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Ver Cancer. 2006; 6(11): 857-66. Tam W. The emergent role of microRNAs in molecular diagnostics of cancer. J 28. Mol Diagn. 2008; 10(5): 411-414.

29. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. Biomed Res Int. 2015; 2015: 125094.

Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, et al. Enhanced 30. stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. Br J Cancer. 2012; 107(4): 684-94.

31. Murria Estal R, Palanca Suela S, de Juan Jiménez I, Egoavil Rojas C, García-Casado Z, Juan Fita MJ, et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2013; 142(1): 19-30.

32. Tanic M, Yanowski K, Gómez-López G, Rodriguez-Pinilla MS, Marquez-Rodas I, Osorio A. et al. MicroRNA expression signatures for the prediction of BRCA1/2 mutation-associated hereditary breast cancer in paraffin-embedded forman-fixed breast tumors. Int J Cancer. 2015; 136(3): 593-602.

33. Vos S, Vesuna F, Raman V, van Diest PJ, van der Groep P. miRNA expression patterns in normal breast tissue and invasive breast cancers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers. Oncotarget. 2015; 6(31): 32115-32137.

34. Tung NM, Garber JE. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. Br J Cancer. 2018 Jul;119(2):141-152.

35. Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. Oncotarget. 2016 Dec 6;7(49):80465-80481.

36. Palmero EI, Galvão HCR, Fernandes GC, de Paula AE, Oliveira JC, Souza CP, et al. Oncogenetics service and the Brazilian public health system: the experience of a reference Cancer Hospital. Genet Mol Biol. 2016; 39(2): 168-177.

37. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. Ann Oncol. 2013; 24(9): 2206-2223.

38. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Oncol Pract. 2010: 6(4): 195-7.

39. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011; 103(22): 1656-64.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. 40. Recommendations for human epidermal growth fator receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013; 31(31): 3997-4013.

Waggot D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. NanoStringNorm: an 41. extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data. Bioinformatics. 2012; 28(11): 1546-8.

42. Wu G, Dawson E, Duong A, Haw R, Stein L. ReactomeFIViz: a Cytoscape app for pathway and network-based data analysis. Version 2. F1000Res. 2014; 3: 146.

Anuj, Arivazhagan L, Venkatraman G, Rayala SK. Increased Expression of 43. MicroRNA 551a by c-Fos Reduces Focal Adhesion Kinase Levels and Blocks Tumorigenesis. Mol Cell Biol. 2019; 39(7); pii: e00577-18.

44. Tang W, Zhang X, Tan W, Gao J, Pan L, Ye X, et al. miR-145-5p Suppresses Breast Cancer Progression by Inhibiting SOX2. J Surg Res. 2019; 236:278-287.

Dai W, He J, Zheng L, Bi M, Hu F, Chen M, et al. miR-148b-3p, miR-190b, and miR-45. 429 Regulate Cell Progression and Act as Potential Biomarkers for Breast Cancer. J Breast Cancer. 2019; 22(2):219-236.

565 47. Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andrés R, Márquez-Rodas I, Osorio A, 566 et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in 567 regulating KRAS oncogene. PLoS One. 2012; 7(6): e38847.

48. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordonez B, et al. mRNA
transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes.
BMC Biotechnol. 2011; 11:46.

573 49. Sun Z, Asmann YW, Kalari KR, Bot B, Eckel-Passow JE, Baker TR, et al. Integrated 574 analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast 575 cancer cells by deep sequencing. PLoS One. 2011; 6(2): e17490.

577 50. Northcott PA, Shih DJ, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, 578 and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. Acta 579 Neuropathol. 2012 Apr;123(4):615-26.

51. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al.
Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter
Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. 2015 Jul
1;75(13):2587-93.

586

587

588 FIGURE TITLES

Figure 1. Heat map showing a supervised clustering of differentially expressed miRNAs
between NBT and SBC. Each column indicates a sample and each row, a microRNA. Red
color indicates upregulation and green, downregulation. NBT: normal breast tissues;
SBC; sporadic breast cancers.

Figure 2. Heat map showing a supervised clustering of differentially expressed miRNAs
between NBT and HBC. Each column indicates a sample and each row, a miRNA. Red
color indicates upregulation and green, downregulation. NBT: normal breast tissues;
HBC: hereditary breast cancers.

Figure 3. Expression patterns of the best biomarkers according to ROC curve analysis between NBT and HBC. A) Heat map showing supervised clustering of the best biomarkers. Each column indicates a sample and each row, a miRNA. Red color indicates upregulation and green, downregulation. B) Expressive upregulated cluster of miRNAs in hereditary breast cancer (especially BRCAX) vs normal breast tissues. NBT: normal breast tissues; HBC: hereditary breast cancers.

 Table 1. Clinicopathological features of the patients included in the differential expression analyses.

		HBC		SBC	NBT		
Characteristics	BRCA1	BRCA2	BRCAX		BRCA1/2	WT	
	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 14	n = 23	<i>n</i> = 5		
Clinical							
Age at diagnosis, y							
Mean (SD)	43.73 (8.30)	44.57 (11.18)	41.78 (12.14)	48.73 (10.45)	41.80 (5.89)	58.00 (9.16)	
Range	29 - 59	26 - 67	25 - 66	30 - 77	35 - 51	50 - 68	
Pathological, n (%)							
Grade (SBR)*					-	-	
1	1 (6,7)	0	1 (7.1)	0			
2	4 (26.7)	5 (35.7)	6 (42.9)	3 (13)			
3	10 (66.7)	9 (64.3)	7 (50)	20 (87)			
ER*					-	-	
Negative	12 (80)	4 (28.6)	5 (35.7)	17 (73.9)			
Positive	3 (20)	10 (71.4)	9 (64.3)	30 (26.1)			
PR*					-	-	
Negative	11 (73.3)	6 (42.9)	7 (50)	19 (82,6)			
Positive	4 (26.7)	8 (57.1)	7 (50)	4 (17.4)			
HER2 amplification*					-	-	
Negative	14 (93.3)	12 (85.7)	11 (78.6)	19 (82,6)			
Positive	1 (6.7)	2 (14.3)	3 (21.4)	4 (17.4)			
Molecular subtype*					-	-	
Luminal	4 (26.7)	11 (78.6)	9 (64.3)	6 (26.1)			
HER2+	0	0	2 (14.3)	1 (4.3)			

Triple-negative	11 (73.3)	3 (21.4)	4 (21.4)	16 (69.6)		
TNM*					-	-
I	2 (13.3)	0	3 (21.4)	1 (4.3)		
П	9 (60)	4 (28.6)	9 (64.3)	11 (47.8)		
Ш	3 (20)	8 (57.1)	1 (7.1)	10 (43.5)		
IV	1 (6.7)	2 (14.3)	2 (7.1)	1 (4.3)		

(*) For breast tumors only.

HBC, hereditary breast cancer; SBC, sporadic breast cancer; NBT, normal breast tissue; WT, wild-type; y, years; SD, standard deviation; SBR, Scarff-Bloom-Richardson; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

	N	ormal vs	. BRCA	1	No	Normal vs. BRCA2		Normal vs. BRCAX				
microRNA	Sen	Spe	AUC	Cutoff	Sen	Spe	AUC	Cutoff	Sen	Spe	AUC	Cutoff
hsa-miR-28-5p	87%	88%	0.91	4.07	78%	88%	0.84	4.49	100%	100%	1.00	5.37
hsa-miR-361-3p	93%	75%	0.88	2.49	71%	100%	0.89	3.35	100%	100%	1.00	3.38
hsa-miR-93-5p	87%	100%	0.93	4.94	86%	100%	0.90	4.97	100%	100%	1.00	5.91
hsa-miR-32-5p	93%	75%	0.88	2.64	93%	100%	0.93	3.14	100%	100%	1.00	4.24
hsa-miR-191-5p	80%	88%	0.85	5.61	86%	100%	0.94	6.20	93%	100%	0.99	6.11
hsa-miR-27b-3p	87%	75%	0.88	3.48	71%	88%	0.82	4.02	100%	100%	1.00	4.74
hsa-miR-21-5p	60%	100%	0.81	7.20	86%	100%	0.89	7.11	100%	100%	1.00	7.88
hsa-miR-16-5p	73%	88%	0.87	6.07	78%	88%	0.85	5.92	100%	100%	1.00	6.54
hsa-miR-340-5p	67%	88%	0.83	3.55	78%	88%	0.87	3.55	93%	100%	0.99	4.16
hsa-miR-194-5p	100%	63%	0.81	1.71	78%	88%	0.86	2.78	93%	88%	0.95	2.69
hsa-miR-142-3p	80%	100%	0.93	6.10	71%	100%	0.82	7.39	93%	100%	0.98	6.92
hsa-miR-22-3p	80%	88%	0.91	3.50	78%	100%	0.84	4.13	100%	100%	1.00	4.10
hsa-miR-15b-5p	87%	75%	0.88	4.50	71%	100%	0.84	6.47	100%	100%	1.00	6.05
hsa-miR-141-3p	80%	100%	0.92	5.36	78%	100%	0.89	5.99	93%	100%	0.93	5.77
hsa-miR-106b-5p	87%	88%	0.92	3.80	93%	75%	0.88	3.21	100%	100%	1.00	4.49
hsa-miR-425-5p	93%	75%	0.85	1.66	86%	88%	0.95	2.21	93%	88%	0.96	2.43
hsa-miR-4454 + hsa-miR-7975	73%	100%	0.88	13.72	71%	88%	0.82	13.33	100%	100%	1.00	13.88
hsa-miR-196a-5p	73%	100%	0.87	4.24	86%	100%	0.96	4.29	100%	88%	0.99	4.07
hsa-miR-324-5p	80%	88%	0.88	3.07	86%	88%	0.84	3.29	86%	100%	0.95	3.62
hsa-miR-20a-5p + hsa-miR-20b- 5p	67%	88%	0.80	5.06	71%	100%	0.83	5.79	100%	88%	0.98	5.01
hsa-let-7d-5p	73%	75%	0.83	5.90	71%	88%	0.81	6.36	100%	100%	1.00	6.64
hsa-miR-19a-3p	67%	100%	0.81	3.21	71%	88%	0.80	3.02	93%	100%	0.99	3.43
hsa-miR-146a-5p	100%	75%	0.89	3.78	71%	88%	0.85	4.42	86%	88%	0.95	4.43
hsa-miR-200c-3p	87%	75%	0.88	7.11	71%	100%	0.87	7.95	78%	100%	0.86	7.78
hsa-miR-106a-5p + hsa-miR-17-5p	60%	100%	0.81	4.79	64%	100%	0.80	4.84	78%	88%	0.92	4.47

Table 2. ROC curve analysis for miRNAs as potential biomarkers in hereditary breast cancer.

Sen, sensitivity; spe, specificity; AUC, area under the curve.

Table 3. Top five pathways related to the best target candidates of miRNAs differentially expressed between normal tissues and *BRCA1/2*-germline mutation carriers and BRCAX cases.

Pathway	Genes (targets)	FDR-corrected Pvalue
ErbB signaling pathway	AKT2, AKT3, PRKCB, PLCG1, STAT5B, JUN, CDKN1A, CDKN1B, EGFR, NRAS, MAP2K4, MAP2K1, ABL1, PIK3CB, NRG1, PIK3CA, SRC, CBL, ERBB3, ERBB4, MAPK1, KRAS	2,89E-15
FoxO signaling pathway	AKT2, AKT3, CREBBP, ATM, CDKN1A, CDKN1B, IKBKB, SGK1, EGFR, NRAS, STAT3, STK11, CCND2, CCND1, EP300, MAP2K1, FOXO3, FOXO1, SMAD2, SMAD4, SMAD3, BCL6, MDM2, PTEN, PIK3CB, TGFBR2, PIK3CA, MAPK1, KRAS	2,89E-15
MicroRNAs in cancer	TP63, PRKCB, TP53, PLCG1, CREBBP, ATM, EZH2, CDKN1A, CDKN1B, BRCA1, IKBKB, RHOA, EGFR, NRAS, CDKN2A, STAT3, TNC, CCND2, CCND1, PIM1, EP300, MAP2K1, FOXP1, CCNE1, NOTCH2, NOTCH1, SOCS1, ABL1, HMGA2, CDK6, MDM2, BCL2, MDM4, FGFR3, PTEN, CASP3, PIK3CA, MET, ERBB3, MAPK1, APC, KRAS	2,89E-15
PI3K-Akt signaling pathway	PPP2R1A, AKT2, MYB, AKT3, KDR, TP53, CDKN1A, CDKN1B, BRCA1, IKBKB, RAC1, JAK1, KIT, SGK1, EGFR, NRAS, TNC, STK11, CCND3, CCND2, CCND1, MAP2K1, TSC1, CCNE1, CSF1R, FOXO3, CDK6, MDM2, BCL2, FGFR3, FGFR2, FGFR1, PTEN, PIK3CB, ITGAV, PIK3CA, MET, MAPK1, KRAS	2,89E-15
Breast cancer	RB1, AKT2, AKT3, TP53, JUN, CDKN1A, BRCA1, NCOA1, KIT, EGFR, NRAS, CTNNB1, CCND1, MAP2K1, NOTCH2, NOTCH1, ESR1, CDK6, FGFR1, PTEN, PIK3CB, AXIN2, PIK3CA, MAPK1, TCF7L2, APC, KRAS	2,89E-15

FDR, false discovery rate.





02 -02



Figure 3



taa min 20-10 taa min 20-10 taa ah 70-10 taa ah 70-10

144 - 147 (d. 15) 144 - 147 (d. 15) 144 - 147 (d. 15)

14 (14) (17) (19) 14 (14) (17) (17) (19) 14 (14) (17) (17) (17) 14 (14) (17) (17) (17)