



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI - LIKA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM BIOLOGIA APLICADA À
SAÚDE

ALEXANDRE CÉSAR VIEIRA DE SALES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-21, MIRNA-155 E MIRNA-195 NO TECIDO
TUMORAL E NO SORO DE MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE
MAMA**

Recife

2019

ALEXANDRE CÉSAR VIEIRA DE SALES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-21, MIRNA-155 E MIRNA-195 NO TECIDO
TUMORAL E NO SORO DE MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE
MAMA.**

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Métodos diagnósticos

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Sales, Alexandre César Vieira de

Análise da expressão do Mirna-21, Mirna-155 e Mirna-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com câncer de mama / Alexandre César Vieira de Sales. – 2019.

86 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto.

Coorientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Tese (doutorado)– Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Mamas – Câncer. 2. Tumores. 3. Expressão gênica. I. Souto, Fabrício Oliveira (Orientador) II. Lima Filho, José Luiz de (Coorientador). III. Título.

616.96901

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020 - 025

ALEXANDRE CÉSAR VIEIRA DE SALES

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-21, MIRNA-155 E MIRNA-195 NO TECIDO TUMORAL E NO SORO DE MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE MAMA.

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 12/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Orientador)
Núcleo de Ciências da Vida – NCV/CAA/UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Profa. Dra. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)
Departamento de Genética – UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães (Examinador Interno)
Departamento de Genética – UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Profa. Dra. Andreia Cristina de Melo (Examinadora Externa)
Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Nacional de Câncer
– INCA

Profa. Dra. Leuridan Cavalcante Torres (Examinadora Externa)
Centro de Pesquisas do Hospital do Câncer de Pernambuco – HCP
Centro de Pesquisas do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP

Aos meus pais Antônio e Adeilda Sales que sempre alimentaram os meus sonhos a despeito de tudo e de todos,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao final de mais esta etapa em minha formação acadêmica, gostaria de agradecer imensamente a todas as mulheres que, voluntariamente, consentiram em participar desta pesquisa.

Agradeço, ainda, ao colega Prof. Dr. Luiz Alberto Mattos por ter me apresentado ao LIKA e me motivado a participar da seleção para o programa de Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde – PPGBAS.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho por ter me acolhido no PPGBAS/LIKA e por ter me ensinado que precisamos querer mudar o mundo com nosso trabalho.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto, por ter participado – sempre com muita leveza e disponibilidade em ajudar – desta caminhada.

Aos pesquisadores integrantes do nosso grupo: Isaura Gomes, Matheus Leite, Leandro Coutinho, Renata Bezerra. Obrigado pela ajuda com a pesquisa em bancada!

Aos médicos do Departamento de Mastologia do Hospital do Câncer de Pernambuco – HCP e ao cirurgião plástico Jonathan Vidal que, gentilmente, colaboraram com a coleta das amostras teciduais utilizadas nesta pesquisa.

Aos servidores do arquivo e da patologia clínica do HCP pela presteza em ajudar na coleta de dados para esta pesquisa.

Às minhas mentoras Ângela Brainer, Ana Karine Coelho e Eleonor Benício por todos os ensinamentos de vida que tornaram essa jornada mais leve.

Aos meus amigos que sempre me incentivam, fizeram-se presentes e compreenderam meus momentos de silêncio, de ausência e de chatice, com muita amorosidade.

A Luiz Antônio Rodrigues, companheiro de todas as horas, por estar sempre ao meu lado, fazendo dos meus, os seus próprios desafios e vitórias.

À minha família que representa o meu maior incentivo e o meu mais robusto alicerce.

Por fim, a Deus por ser o que é.

OBRIGADO!

“Acontece que a biologia dos fatos é bem diferente da história que eu sinto.”
(SOARES, 2019, p. 121).

RESUMO

O câncer de mama corresponde à neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres e, no Brasil, é diagnosticado em estágios mais avançados da doença. Diversos miRNAs encontram-se desregulados no tecido tumoral e nos fluidos corporais e têm sido apontados como biomarcadores com potencial diagnóstico, prognóstico e também de predição de resposta a determinado tratamento. O estudo objetivou analisar a expressão dos miRNA-21, miRNA-155 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama e correlacioná-las com a resposta à quimioterapia neoadjuvante e com variáveis clinicopatológicas dessa doença. A expressão dos miRNA-21, miRNA-155 e miRNA-195 foi avaliada por qRT-PCR em fragmentos de tecido tumoral e no soro de mulheres com diagnóstico de câncer de mama e comparadas com amostras biológicas correspondentes de controles saudáveis. Estabeleceu-se, então, correlação da expressão dessas moléculas com exposição à quimioterapia neoadjuvante e com as seguintes variáveis clinicopatológicas: tamanho tumoral, estadiamento TNM, grau histopatológico, subgrupo molecular da doença e acometimento linfonodal axilar. Foram observados níveis aumentados da expressão do miRNA-21 e suprimidos da expressão do miRNA-195 no tecido tumoral das pacientes com câncer de mama, independentemente da exposição prévia à quimioterapia. Não houve diferença significativa na expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 no soro das pacientes com câncer de mama em relação aos controles. A expressão do miRNA-155 mostrou-se muito heterogênea entre as amostras e, por vezes, indetectável no tecido tumoral e, sobremaneira, no soro dos casos e dos controles e, portanto, fora excluída das análises. Concluímos que o miRNA-21 e o miRNA-195 se mostraram significativamente desregulados no tecido tumoral das pacientes com câncer de mama, independente de tratamento prévio com quimioterapia. Não houve diferença significativa na expressão desses miRNAs no soro das pacientes doentes em comparação aos seus controles. Assim, o papel de biomarcadores diagnósticos e/ou prognósticos dessas moléculas no soro de pacientes com câncer de mama não pode ser confirmado, ao menos neste estudo.

Palavras-chave: Câncer de mama. miRNA-21. miRNA-155. miRNA-195. Tecido tumoral. Soro.

ABSTRACT

Breast cancer represents the most common neoplasia among women worldwide and, in Brazil, presents with more advanced stages at the initial diagnosis of the disease. Various miRNAs are dysregulated in the tumor tissue and in circulating body fluids and they have been described as promising biomarkers for breast cancer diagnosis, prognosis and response to different treatments. The aim of this study was to assess miRNA-21, miRNA-155 and miRNA-195 expression in the tumor tissue and serum of a cohort of female Brazilian breast cancer and to correlate them with clinicopathological variables and response to neoadjuvant chemotherapy. Utilizing quantitative qRT-PCR, miRNA-21, miRNA-155 and miRNA-195 expression in the tumor tissue and serum were measured in a cohort of female breast cancer patients and compared with their corresponding biological samples from healthy women. The correlation of those miRNAs expression with previous exposition to systemic chemotherapy and other clinicopathologic variables such as tumor size, TNM staging, histologic grade, breast cancer molecular subtypes and axillary status of the axilla were also assessed. miRNA-21 was upregulated and miRNA-195 was suppressed in the tumor tissue of the 55 breast cancer patients included in the study, regardless of their previous exposition to neoadjuvant chemotherapy. It was not observed any significant difference in terms of miRNA-21 and miRNA-195 expression in the serum samples of breast cancer patients in comparison to their controls. The expression of miRNA-155 was very heterogeneous among the tissue and serum samples or even undetectable and, therefore, were excluded of the analysis. We concluded that the miRNA-21 and miRNA-195 expression levels were significantly dysregulated in the tumor tissue of breast cancer patients, regardless of their previous exposition to systemic chemotherapy. However, their expression in the serum samples have not demonstrated any significant difference between breast cancer patients and healthy controls. Thus, their roles as diagnostic and prognostic biomarkers in the serum of breast cancer patients could not be confirmed in this study.

Keywords: Breast cancer. miRNA-21. miRNA-155. miRNA-195. Tumor tissue. Serum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	– Distribuição da incidência de casos novos de câncer no Brasil no biênio 2018/2019.....	15
Figura 2	– Taxas brutas de incidência para o Estado de Pernambuco no biênio 2018/2019	16
Quadro 1	– Definição dos subtipos moleculares do câncer de mama pela classificação de Saint Gallen	19
Figura 3	– Biogênese e maturação do miRNA	24
Quadro 2	– Exemplos de estudos que apontaram miRNAs como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta a drogas.....	26
Figura 4	– miRNAs biomarcadores para câncer de mama e marcas do câncer.....	30
Tabela 1	– Descrição de miRNAs analisados no tecido e na corrente sanguínea no mesmo estudo.....	31

ARTIGO ORIGINAL 1

Tabela 1	– Características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama	46
Figura 1	– Expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 em tecido tumoral de câncer de mama	47
Tabela 2	– Expressão do miRNA-21 de acordo com fatores prognósticos do câncer de mama.	48
Figura 2	– Correlação entre a expressão tecidual do miRNA-21 e o tamanho do tumor	49
Figura 3	– Correlação entre o tamanho clínico do tumor e a expressão tecidual do miRNA-195	50
Tabela 3	– Expressão do miRNA-195 de acordo com fatores prognósticos do câncer de mama	50
Figura 4	– Expressão tecidual do miRNA-21 de acordo com exposição à quimioterapia neoadjuvante	52
Figura 5	– Expressão tecidual do miRNA-195 de acordo com exposição à quimioterapia neoadjuvante	52

Figura 6	–	Expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 entre pacientes com câncer de mama	53
Tabela 4	–	Expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 de acordo com variáveis clinicopatológicas do câncer de mama	53
Figura 7	–	Correlação da expressão sérica dos miRNA-195 e miRNA-21 de acordo com o tamanho do tumor	54
Tabela 5	–	Expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 de acordo com exposição à quimioterapia neoadjuvante	55

ARTIGO ORIGINAL 2

Tabela 1	–	Características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama	70
Figura 1	–	Expressão do miR-155-3p no tecido tumoral (caso) em comparação ao grupo controle	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA-1/BRCA-2	Genes de predisposição ao câncer de mama 1 e 2
CLI	Carcinoma lobular infiltrante
CINE	Carcinoma invasivo do tipo não especial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Receptor de estrogênio
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
HCP	Hospital do Câncer de Pernambuco
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento do epitélio humano
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Ki-67	Índice de proliferação celular Ki-67
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
miR/miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
PD-L1	Ligante programado de morte 1
PET-CT	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PR	Receptor de progesterona
qRT-PCR	Reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNM	Ressonância nuclear magnética
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	Fator do crescimento do epitélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	O CÂNCER DE MAMA.....	15
2.1.1	Aspectos epidemiológicos.....	15
2.1.2	Rastreamento e diagnóstico precoce.....	16
2.1.3	Diagnóstico do câncer de mama.....	17
2.1.4	Patologia do câncer de mama.....	18
2.1.5	O estadiamento do câncer de mama.....	20
2.1.6	O tratamento do câncer de mama.....	21
2.2	BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS E PROGNÓSTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA.....	21
2.3	OS miRNAs.....	22
2.3.1	A biogênese dos miRNAs.....	22
2.3.2	Os miRNAs e o câncer.....	24
2.4	OS miRNAs E O CÂNCER DE MAMA.....	27
2.5	OS MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS miRNAs.....	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	ARTIGO ORIGINAL 1 - Avaliação do nível de expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama	38
4.2	ARTIGO ORIGINAL 2 - Análise da expressão do miRNA-155 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama	63
5	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	83

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem havido um grande avanço quanto à compreensão e à identificação dos mecanismos moleculares que regem a origem, a progressão e o padrão de disseminação do câncer de mama e que, por sua vez, repercutem diretamente na identificação de novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

Nesse contexto, tem se observado a emergência de novos biomarcadores para essa doença; isto é, substâncias que podem ser medidas experimentalmente e que indicam o funcionamento normal, patológico ou a resposta frente a agentes farmacológicos em um dado organismo. A identificação de mutações dos genes BRCA-1 e BRCA-2, a superexpressão da oncoproteína Her-2 por imunohistoquímica (IHQ) ou por hibridização “in situ” por fluorescência (FISH) e o surgimento de painéis de risco genéticos para o câncer de mama representam exemplos de biomarcadores com potencial prognóstico, preditivo e capazes de nortear a escolha de tratamentos mais personalizados e eficazes para o câncer de mama.

Contudo, as estratégias para o rastreamento e para o diagnóstico do câncer de mama sofreram poucas alterações ao longo do tempo. Atualmente, a mamografia permanece como exame padrão ouro para o rastreio do câncer de mama entre mulheres a partir dos 40 anos de idade e naquelas com risco aumentado para o câncer de mama hereditário. Outros métodos diagnósticos como a ecografia e a ressonância nuclear magnética das mamas são considerados complementares à mamografia e têm, em geral, elevado custo.

No que tange ao diagnóstico dessa neoplasia, tanto para os casos identificados pelo rastreamento ou a partir da presença de sinais e/ou de sintomas da doença, a biópsia tecidual acrescida do exame anatomopatológico e IHQ constituem as técnicas mais utilizadas, atualmente.

Destarte, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas capazes de desenvolver e de testar novos métodos com potencialidade diagnóstica, prognóstica e preditiva para o câncer de mama que agreguem características de factibilidade, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e de baixo custo.

Nesse contexto, inúmeras moléculas têm sido identificadas e testadas como potenciais biomarcadores diagnósticos, prognósticos, preditivos e terapêuticos para os mais diversos tipos de câncer. Dentre essas, destacam-se os microRNAs (miRNAs), pequenas espécies de ácido ribonucleico (RNA) presentes no tecido tumoral e na circulação de pacientes com câncer e que, frequentemente, encontram-se desreguladas nessa população.

Existe uma vasta quantidade de artigos científicos a explorarem e a ratificarem o potencial de inúmeros miRNAs como biomarcadores para o câncer de mama, sobretudo diagnósticos e prognósticos. Contudo, existe uma grande variabilidade quanto à identificação e à seleção dos miRNAs mais sensíveis e específicos para os diversos tipos de câncer e, também, quanto à metodologia de isolamento dessas moléculas no tecido tumoral e nos fluidos corpóreos, sobretudo no soro e no plasma.

Ademais, escassos são os estudos que comparam, na mesma publicação, a expressão de certos grupos de miRNAs no tecido tumoral e circulantes. A expressão concordante de uma dada molécula no tecido tumoral e circulante favorece e corrobora sua validação como potencial biomarcador diagnóstico e/ou prognóstico.

Assim, o propósito da presente tese foi analisar a presença e o grau de expressão dos miRNA-21, miRNA-155 e do miRNA-195 – descritos na literatura, separadamente, como biomarcadores muito promissores para o diagnóstico e para o prognóstico do câncer de mama – no tecido tumoral e no soro de pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de mama, através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), no intuito de compreender como essas moléculas se comportam numa coorte de mulheres do nordeste brasileiro e, a partir dos resultados obtidos, agregar conhecimento e novas perspectivas de aplicabilidade prática desses miRNAs .

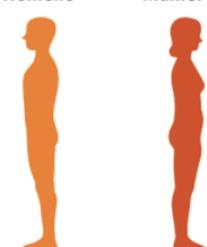
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CÂNCER DE MAMA

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

O câncer de mama corresponde à neoplasia mais comum entre as mulheres e, anualmente, estima-se uma média de 2,1 milhões de casos novos da doença em todo o mundo (FERLAY et al., 2019). No Brasil, o número de novos casos dessa doença previsto para o biênio 2018-2019, segundo o Instituto Nacional de Câncer – INCA, foi de 59.700 por ano, com risco estimado de 56,3 casos para cada 100.000 mulheres (Figura 1). Na região Nordeste do país, estimam-se 11.860 novos casos para esse mesmo período, dos quais 2.680 referem-se ao estado de Pernambuco (Figura 2), onde a grande maioria dos casos diagnosticados se concentram na capital do Estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 1 – Distribuição da incidência de casos novos de câncer no Brasil no biênio 2018/2019.

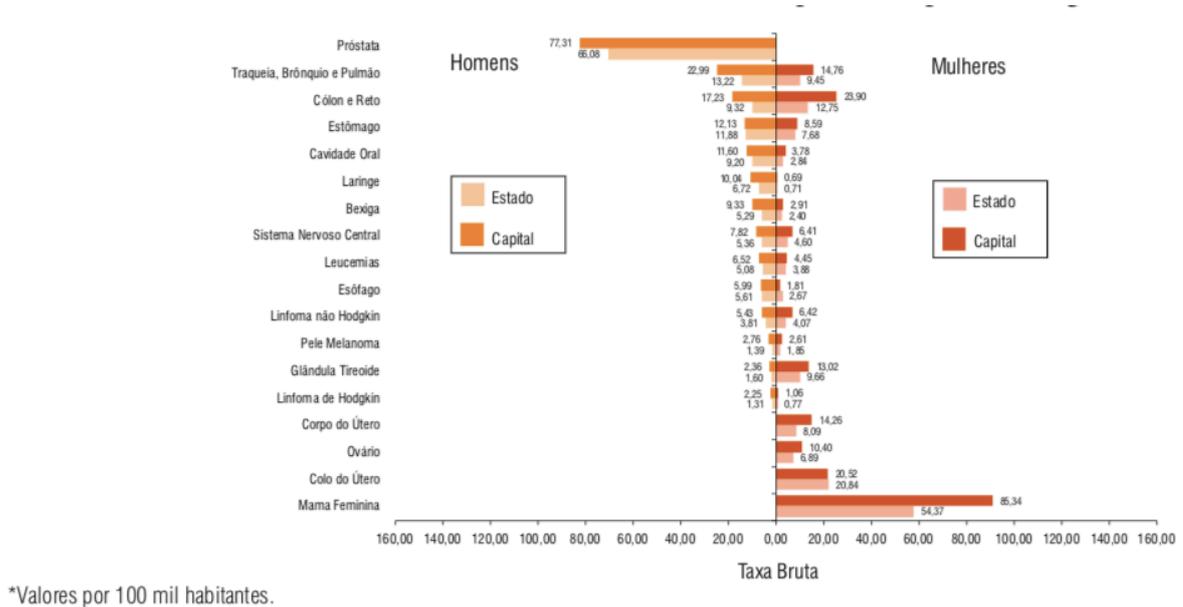
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	 <p>Homens Mulheres</p>	Mama Feminina	59.700	29,5%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%		Cólon e Reto	18.980	9,4%	
Cólon e Reto	17.380	8,1%		Colo do Útero	16.370	8,1%	
Estômago	13.540	6,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%	
Cavidade Oral	11.200	5,2%		Glândula Tireoide	8.040	4,0%	
Esôfago	8.240	3,8%		Estômago	7.750	3,8%	
Bexiga	6.690	3,1%		Corpo do Útero	6.600	3,3%	
Laringe	6.390	3,0%		Ovário	6.150	3,0%	
Leucemias	5.940	2,8%		Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%	
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%		Leucemias	4.860	2,4%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Incidência de câncer no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população mundial apresenta uma curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 13,68 óbitos/100.000 mulheres em 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 2 – Taxas brutas de incidência para o Estado de Pernambuco no biênio 2018/2019.



Fonte: Incidência de câncer no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar de apresentar uma relação de risco familiar bem estabelecida, somente 25% dos novos casos diagnosticados de câncer de mama estão associados a um histórico familiar positivo para essa doença. A ocorrência de síndromes hereditárias para o câncer de mama relacionadas a mutações de genes específicos (BCRA1, BCRA2, p53, ATM, CHEK2, PTEN, MLH1, MSH2, PALB2) gira em torno de 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama e inclui, via de regra, mulheres com forte histórico familiar dessa doença e mais jovens ao diagnóstico (ROSENSTOCK; HORTOBAGYI, 2016).

Percebe-se, portanto, que a maior parte dos novos casos de câncer de mama são considerados esporádicos por não guardarem relação de risco com mutações genéticas específicas e conhecidas. Para esse grupo são reconhecidos outros fatores de risco, tais como: obesidade; ocorrência de menarca precoce e de menopausa tardia; nuliparidade; primeira gravidez após 30 anos de idade; uso de anticoncepcionais orais e de terapia de reposição hormonal em mulheres na menopausa (ROSENSTOCK; HORTOBAGYI, 2016).

2.1.2 Rastreamento e diagnóstico precoce

Nas últimas décadas, houve uma grande evolução no conhecimento sobre o câncer de mama, sobretudo no que concerne à melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese, na proliferação e na disseminação dessa doença. Contudo, pouco se

evoluiu no que tange aos métodos de rastreamento dessa doença (SMITH; DUFFY; TABAR, 2012).

A mamografia ainda é considerada o exame padrão-ouro para o diagnóstico precoce do câncer de mama, sobretudo se realizada entre mulheres após os 40 anos de idade. Recente metanálise demonstrou que a realização desse exame como método de rastreio para o câncer de mama resulta em uma redução de mortalidade por essa doença da ordem de 20% (NELSON et al., 2012).

No Brasil, desde 2004, adotou-se um programa nacional de rastreamento do câncer de mama para mulheres com mais de 50 anos. Pretendia-se, dessa forma, realizar o diagnóstico mais precoce, em estágios mais iniciais dessa doença e, conseqüentemente, reduzir a taxa de mortalidade, haja visto que as chances de cura são tão maiores quanto em estágios mais iniciais o câncer de mama for detectado (GEBRIM; QUADROS, 2006).

Contudo, recente levantamento da rede nacional de registro hospitalar de câncer, realizado por dos-Santos-Silva et al. (2019) com 247.719 mulheres, apontou que o percentual de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em estágio avançado alcançava 40% e compreendia, predominantemente, mulheres da raça negra e com baixa escolaridade. Argumentaram, ainda, os autores que a adoção da mamografia de rastreio para o câncer de mama, no Brasil, teve pouco impacto na detecção da doença em estágios iniciais e em redução da mortalidade câncer específica.

No Brasil, país de dimensões continentais e com graves problemas de acesso ao Sistema Único de Saúde – SUS, muitas mulheres com indicação para a realização da mamografia de rastreamento não conseguem realizá-lo ou, quando conseguem, têm dificuldade para realizar a biópsia e iniciar o tratamento específico da doença (AZEVEDO E SILVA et al., 2014).

2.1.3 Diagnóstico do câncer de mama

Seja diagnosticado por rastreio, através da mamografia ou identificado a partir da percepção de sinais e/ou sintomas da doença, como: palpação de nódulos na mama ou na axila, inversão do mamilo, descarga sanguinolenta pelo mamilo e alterações da pele; o câncer de mama requer confirmação diagnóstica a partir da obtenção de fragmento tumoral por biópsia por agulha grossa guiada por ultrassonografia (*core biopsy*); por biópsia excisional, em que toda a lesão suspeita é retirada através de um procedimento cirúrgico e por biópsia incisional, na qual somente um fragmento do tumor é removido também através de procedimento cirúrgico (BALARO; GOMES; KESTELMAN, 2013).

Assim, diante da suspeita clínica ou radiológica de um câncer de mama, faz-se mister a obtenção de fragmento tecidual para que se realize, idealmente em laboratórios de referência e antes da exposição a qualquer modalidade de tratamento, a confirmação do subtipo histológico e a quantificação da expressão imunoistoquímica de alguns biomarcadores que fornecerão informações acerca do prognóstico da doença e que nortearão a escolha do tratamento mais apropriado, após a definição do estadiamento da doença e do subtipo molecular (KATZ et al., 2017).

2.1.4 Patologia do câncer de mama

Do ponto de vista histopatológico, as neoplasias mamárias podem ser classificadas em não invasivas (carcinomas *in situ*) e invasivas. Os carcinomas ductal e lobular *in situ* representam uma proliferação celular atípica restrita à unidade túbulo-lobular da mama. Já os tumores invasivos da mama são classificados entre os tipos especiais e não especiais. Os carcinomas invasivos da mama do tipo não especial, anteriormente denominados carcinomas ductais infiltrantes, são assim denominados por não possuírem achados morfológicos específicos à microscopia e representam cerca de 70 a 80% dos casos (SINN; KREIPE, 2013).

Os carcinomas do tipo especial da mama correspondem a 20 a 30% dos cânceres de mama invasivos. Destes, cerca de 10 a 15% dos casos são representados pelo carcinoma lobular invasivo (CLI), estando os demais tipos representados pelas seguintes neoplasias: adenoide cística, mucinosa, medular, papilífera, neuroendócrina e epidermoide. Linfomas, sarcoma phyllodes e angiossarcomas, apesar de acometerem a mama, não são considerados tipos histológicos típicos de câncer de mama (SINN; KREIPE, 2013).

É importante ressaltar que, quando da avaliação histopatológica da peça cirúrgica, descrevam-se, também: o grau de diferenciação tumoral, que varia de tumores bem diferenciados (grau I) a tumores indiferenciados (grau IV); a presença de invasão de vasos sanguíneos e/ou linfáticos; a ausência ou a presença de infiltração linfocitária peritumoral e o estado das margens cirúrgicas como livres ou comprometidas. Todos esses achados correspondem a biomarcadores prognósticos para o câncer de mama e são, costumeiramente, levados em consideração quando do planejamento do tratamento sistêmico das pacientes com câncer de mama (FITZGIBBONS et al., 2000).

Após a confirmação do tipo histológico do câncer de mama, deve-se proceder a análise imunoistoquímica (IHQ) tecidual da expressão de receptores de estrogênio, de progesterona, da oncoproteína Her-2 e do índice de proliferação celular Ki-67. A identificação dessas moléculas

permitiu que, posteriormente, a observação meramente clínica de que o câncer de mama correspondia a uma doença extremamente heterogênea quanto à sua evolução fosse traduzida em subgrupos fenotípicos bem caracterizados quanto à sua expressão gênica, à sua apresentação clínica, ao seu prognóstico, bem como à resposta a diferentes estratégias terapêuticas (WANG et al., 2011).

Atualmente, são conhecidos cinco subgrupos moleculares do câncer de mama. Os tumores luminais A e B se caracterizam pela expressão IHQ de receptores de estrógeno e/ou de progesterona associados a diferentes índices quantitativos de proliferação celular descritos através do Ki-67 (Quadro 1). Os tumores que apresentam alta expressão da oncoproteína Her-2 pela IHQ ou pelo FISH denominam-se Her-2 superexpressos. Quando não há expressão das moléculas de receptores de estrógeno, de progesterona e do Her-2, define-se este subgrupo como câncer de mama triplo negativo. Caso haja positividade para a oncoproteína Her-2 e para os receptores de estrogênio e/ou de progesterona, define-se o subtipo molecular luminal B Her-2 positivo ou luminal híbrido (GOLDHIRSCH et al., 2011; FALATO et al., 2016).

Quadro 1 – Definição dos subtipos moleculares do câncer de mama pela classificação de Saint Gallen.

Subtipos moleculares	ER e PR	HER-2	Ki-67
Luminal A	ER e/ou PR (+)	HER-2 (-)	Ki-67 < 14%
Luminal B	ER e/ou PR (+)	HER-2 (-)	Ki-67 ≥ 14%
Luminal B HER-2 (+)	ER e/ou PR (+)	HER-2 (+)	Qualquer Ki-67
HER-2 enriquecido	ER e PR (-)	HER-2 (+)	Qualquer Ki-67
Triplo negativo	ER e PR (-)	HER-2 (-)	CK5/6 (+) ou EGFR (+)

ER – receptor de estrógeno, PR – receptor de progesterona, HER-2 – oncoproteína HER-2, Ki-67 – antígeno Ki-67 de proliferação celular, CK5/6 – citqueratinas 5/6, EGFR – receptor do fator de crescimento do epitélio.

Fonte: Goldhirsch et al. (2011).

Mais recentemente e no sentido de se estratificar ainda mais a condução clínica de pacientes com câncer de mama, têm surgido inúmeras publicações a explorarem o papel de diversas moléculas como potenciais biomarcadores para essa doença. Entre eles, destacam-se a pesquisa de células tumorais circulantes no sangue, que tem apresentado resultados conflitantes na literatura quanto ao valor prognóstico desse achado; a presença de DNA tumoral circulante, que tem sido relacionado à resistência a certas drogas como os inibidores de aromatase, por exemplo; e, finalmente, a vários microRNAs (miRNAs ou miRs) circulantes que representam sequências de RNA não-codificantes e que participam da regulação gênica pós-transcricional em quase todos os processos celulares (BERTOLI et al., 2015).

Contudo, pouco se tem evoluído, efetivamente, na identificação de métodos de rastreio e de diagnóstico moleculares para o câncer de mama capazes de representar uma complementação ou alternativa aos métodos de imagem tradicionais para o diagnóstico da doença, sobretudo, a mamografia. Ademais, faz-se necessária, ainda, a pesquisa de novos biomarcadores prognósticos e preditivos de resposta aos mais diversos tratamentos, capazes de melhor nortear o planejamento terapêutico e os desfechos clínicos dele obtidos.

2.1.5 O estadiamento do câncer de mama

O estadiamento clínico do câncer de mama consiste na realização de anamnese e do exame físico da paciente e na solicitação de exames complementares que permitirão analisar o tamanho do tumor, a extensão de acometimento dos linfonodos regionais e a presença, ou não, de metástases à distância (KATZ et al., 2017).

A oitava edição do manual de estadiamento do câncer TNM do *American Joint Committee on Cancer* leva em consideração a combinação dos aspectos anatômicos anteriormente citados (T: tamanho do tumor, N: extensão de acometimento de linfonodos regionais e M: presença de metástases à distância) e dos fatores prognósticos (RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona e Her-2) para estratificar as pacientes entre estágios que variam de 0 a IV e em que se parte da ausência de doença invasiva até a presença de metástases à distância, respectivamente (BRIERLEY et al., 2016).

Como parte do estadiamento, deve-se proceder uma avaliação laboratorial simples, com a solicitação de hemograma completo, painel metabólico hepático e renal, além de cálcio e de fosfatase alcalina que, quando alterados em pacientes assintomáticos, podem sinalizar um possível acometimento ósseo metastático. As pacientes que se apresentam com tumores não palpáveis, sem biópsia que confirme a malignidade da lesão e sem sinais sugestivos de metástases devem ser estadiadas, via de regra, após o tratamento cirúrgico definitivo. No caso de mulheres que se apresentem com tumores maiores que dois centímetros, com carcinoma inflamatório da mama ou com acometimento de linfonodos regionais, deve-se solicitar exames de imagem que incluem: tomografias do tórax e do abdome, cintilografia óssea ou PET-CT oncológico (KATZ et al., 2017).

A documentação da extensão locorregional da doença deve se dar através da solicitação de mamografia bilateral, de ultrassonografia das mamas e das axilas e, em casos selecionados, de ressonância nuclear magnética (RNM) das mamas (LIMA, 2019).

2.1.6 O tratamento do câncer de mama

Ao longo das últimas décadas houve avanço significativo no tratamento do câncer de mama. Destacam-se a utilização de técnicas cirúrgicas menos mutiladoras; a pesquisa do linfonodo sentinela que, ao possibilitar a preservação dos linfonodos axilares, reduziu a ocorrência do linfedema pós-cirúrgico, sequela que muito compromete a qualidade de vida das pacientes; e, também, o emprego de técnicas de radioterapia mais direcionadas ao leito tumoral e com menor irradiação aos tecidos vizinhos, o que reduziu a toxicidade dessa intervenção terapêutica (KATZ et al., 2017).

O tratamento do câncer de mama pode ser conduzido com intuito curativo ou paliativo. No primeiro, observar-se-ão intervenções que poderão ser realizadas antes ou após o tratamento cirúrgico, sendo chamadas de neoadjuvante ou de adjuvante, respectivamente. Quando se objetiva o controle da doença e a melhoria da qualidade de vida, tem-se então o tratamento paliativo (KATZ et al., 2017).

É importante ressaltar que nos casos de tratamento neoadjuvante; isto é, aqueles que são realizados anteriormente ao tratamento cirúrgico definitivo, quando ocorre um total desaparecimento de neoplasia invasiva na avaliação histopatológica da peça cirúrgica da mama e da axila, diz-se que se obteve uma resposta patológica completa (RPC). A ocorrência desse tipo de resposta corresponde a um importante fator de bom prognóstico e também de predição da necessidade de se oferecer, ou não, tratamento sistêmico complementar adjuvante, traduzindo-se, portanto, em ganho potencial de sobrevida global (BERRUTI et al., 2014; CORTAZAR et al., 2014; MASUDA et al., 2017; VON MINCKWITZ et al., 2019).

Ressalta-se, ainda, que o aumento do arsenal de quimioterápicos disponíveis para tratar o câncer de mama; e, principalmente, a descoberta de alvos terapêuticos específicos como os receptores de estrogênio e de progesterona, do receptor tipo 2 do fator de crescimento do epitélio humano (Her-2) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), contribuíram de forma bastante expressiva para a melhoria dos desfechos de sobrevida e de qualidade de vida associados a essa doença. A identificação desses biomarcadores, associados a vias específicas de sinalização para a carcinogênese, traduziu-se no emprego de drogas capazes de bloquear esses alvos de maneira efetiva e com menos efeitos adversos, a exemplo do tamoxifeno e dos inibidores da aromatase, do trastuzumabe e do bevacizumabe, respectivamente (HARRIS et al., 2016; O'SHAUGHNESSY, 2005).

Mais recentemente, Schmid et al. (2018) descreveram, pela primeira vez, o benefício da utilização de imunoterapia com atezolizumabe associado à quimioterapia com nab-paclitaxel,

em termos de ganho em sobrevida livre de progressão, para pacientes com câncer de mama triplo-negativo metastático que apresentavam positividade do biomarcador PD-L1 no exame imunohistoquímico do tumor.

2.2 BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS E PROGNÓSTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA

Durante o surgimento e a progressão do câncer, diversas moléculas sofrem alterações significativas em sua estrutura ou expressão, capazes de lhes conferir o papel de potenciais biomarcadores de significado clínico e que podem ser representados por células tumorais circulantes, ácidos nucleicos, glicoproteínas, anticorpos, enzimas, metabólitos e aptâmeros, por exemplo (JAYANTHI; DAS; SAXENA, 2017).

Essas moléculas, uma vez identificadas, podem representar biomarcadores com potencial diagnóstico, afetas à detecção da doença; prognóstico, quando inferem características da evolução e do desfecho da doença; ou preditivas, neste caso, relacionadas à obtenção de resposta terapêutica ou de resistência a um dado tratamento (VISHNOI; RANI, 2017).

Sobretudo no que diz respeito ao diagnóstico e ao prognóstico do câncer, percebe-se a premente necessidade do desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis, específicas, custo-efetivas e de uso ambulatorial. Destarte, os miRNAs têm atraído muita atenção da comunidade científica ao representarem ferramentas dotadas de bom desempenho analítico e de medida em tempo real (JAYANTHI; DAS; SAXENA, 2017).

2.3 OS miRNAs

2.3.1 A biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são pequenos fragmentos de cadeia única de RNA não codificadores de moléculas e compostos por cerca de 19 a 23 nucleotídeos em sua extensão, que controlam a expressão gênica em diversos processos fisiológicos. Dessa forma, eles exercem um papel importante na regulação pós-transcricional da expressão gênica em uma vasta gama de sistemas biológicos (VISHNOI; RANI, 2017).

Desde a sua descoberta, em 1993, em espécie de nematódeo denominada *Caenorhabditis elegans*, têm-se identificado moléculas de miRNAs em células eucarióticas de

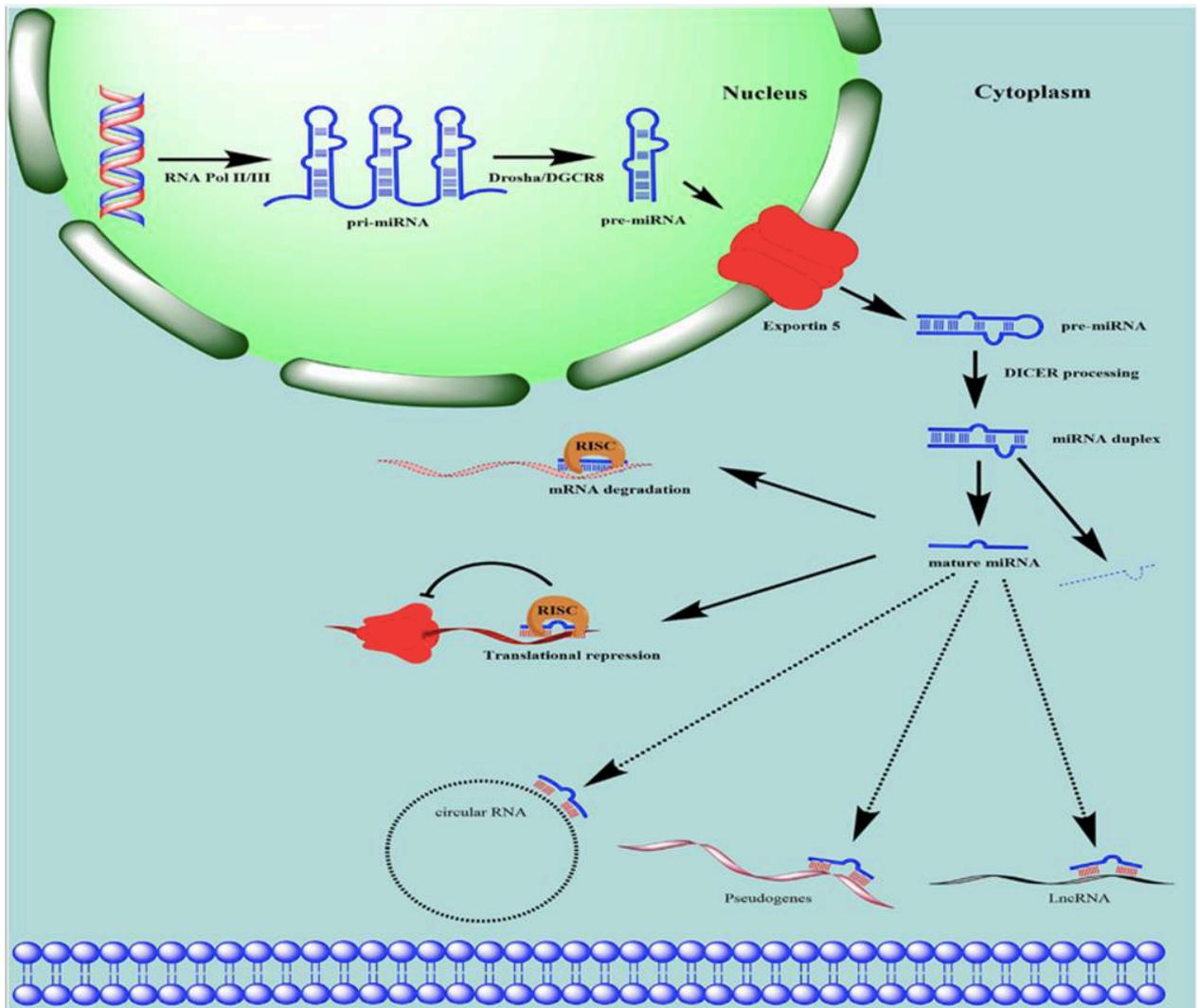
todas as espécies (VISHNOI; RANI, 2017). Em seres humanos, já foram descritos mais de 2500 miRNAs maduros como integrantes do genoma humano e admite-se que eles regulem, aproximadamente, 60% de todas as proteínas codificadas por genes (HAMAM et al., 2017).

Os miRNAs são sintetizados no núcleo a partir dos íntrons de genes codificadores de proteínas do genoma do hospedeiro (Figura 3). A transcrição é mediada pela RNA polimerase II/III e, então, origina-se o miRNA primário (pri-miRNA) que, tão logo formado, é convertido pela RNase III endonuclease Droscha em uma molécula com cerca de 70 nucleotídeos de extensão em forma de grampo de cabelo, chamada de pre-miRNA. Na sequência, o pre-miRNA é transferido ao citoplasma pela exportina-5 e, após exposição à endoribonuclease Dicer, sua alça é clivada dando origem a uma estrutura em dupla-fita composta pelo miRNA e miRNA-antisense. Após degradação do componente “antisense”, o miRNA maduro, com cerca de 22 nucleotídeos, é incorporado no complexo silenciador induzido pelo RNA (RISC) que, por sua vez, liga-se ao mRNA com pareamento completo ou parcial de suas bases. Havendo pareamento completo, o mRNA é degradado e, quando parcial, ocorre supressão da tradução de proteínas (HAMAM et al., 2017; PIMENTEL et al., 2014; VISHNOI; RANI, 2017).

Além de serem detectados em ambiente intracelular dos mais variados tecidos, os miRNAs podem ser encontrados em diversos fluidos corpóreos como sangue, urina, saliva, líquido, sêmen e leite materno (CORTEZ et al., 2011). No meio extracelular, os miRNAs podem circular ligados a complexos ribonucleoproteicos ou a lipoproteínas de alta densidade (HDL). Podem também ser liberados da célula em vesículas lipídicas, microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos (HAMAM et al., 2017).

Ao se ligarem às estruturas moleculares anteriormente descritas, sobremaneira aos exossomos, os miRNAs podem participar da regulação homeostática de um dado organismo ao mediarem comunicação célula a célula, onde os exossomos contendo miRNAs originários de uma célula de origem são incorporados por endocitose a uma outra célula (CHEN et al., 2012). Ademais, adquirem estabilidade ao se tornarem protegidas da ação de RNases presentes nos mais diversos fluidos corporais o que, por conseguinte, pode lhes conferir um longo tempo de meia-vida circulante. No plasma, por exemplo, a meia-vida dos miRNAs pode variar de cinco a oito dias. (GANTIER et al., 2011).

Figura 3 – Biogênese e maturação do microRNA.



Transcrição do pri-miRNA (miRNA primário) e conversão ao pre-miRNA (pré-microRNA) pela endoribonuclease Drosha. Transporte do pre-miRNA ao citoplasma pela exportina-5 onde ocorre maturação do miRNA mediado pela endoribonuclease DICER. Estabilização do miRNA através de sua ligação ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e sua ligação ao mRNA (RNA-mensageiro) onde exerce sua função.
 Fonte: Hamam et al. (2017).

Isto posto, percebe-se que os miRNAs, ao atuarem na regulação gênica pós-transcricional de inúmeras proteínas e por assumirem um importante protagonismo no controle de diversas funções celulares, incluindo-se diferenciação celular, proliferação e apoptose, podem sofrer desregulação em sua biogênese e função quando da ocorrência de diversos processos patológicos como doença de Parkinson, demência de Alzheimer, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (VISHNOI; RANI, 2017).

2.3.2 Os miRNAs e o câncer

Inúmeros mecanismos podem participar de gênese do câncer e, conseqüentemente, desregular a síntese de diversos miRNAs: amplificação do DNA, deleções e/ou mutações relacionadas a um certo *loci* do miRNA e alterações epigenéticas, por exemplo. Como resultado dessas alterações, pode-se ter aumento ou supressão dos níveis teciduais e/ou circulantes de miRNAs específicos que, uma vez desregulados, podem atuar favorecendo ou suprimindo a manifestação de um dado tipo de câncer (HAMAM et al., 2017; SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016).

Assim, os miRNAs são considerados reguladores críticos da expressão gênica e, no câncer, assumem relevante interface ao mediar processos afetos à oncogênese, aos mecanismos de metástases e de resistência a tratamentos antineoplásicos específicos. Caso atuem como oncogenes, favorecendo a expressão fenotípica do câncer, os miRNAs podem ser classificados como oncomiRs e, em geral, estão superexpressados no tecido tumoral e na circulação. São exemplos de oncomiRs: os miRNAs 21 e 155. Caso atuem como genes supressores tumorais, dificultando o surgimento de células neoplásicas - como os miRNAs 15a e 16-1 - são classificados como miRNAs supressores tumorais e, em geral, encontram-se quantitativamente reduzidos (SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016).

Calin et al. (2002) demonstraram, pela primeira vez, a relação entre miRNA e câncer em humanos. Em seus experimentos, observaram que os genes que transcreviam o miRNA-15 e o miRNA-16 estavam localizados no cromossomo 13q14, região frequentemente deletada em cerca de dois terços dos pacientes com leucemia linfocítica crônica de células-B. Posteriormente, outros estudos apontaram que existe uma nítida diferenciação na expressão de vários miRNAs entre células normais e neoplásicas e que são percebidos perfis de expressão ou de supressão de miRNAs específicos para diferentes tipos de neoplasias malignas (CALIN; CROCE, 2006).

Contudo, o fato de um dado miRNA mostrar-se com níveis aumentados ou suprimidos no tecido tumoral e/ou na circulação não indica, necessariamente, que ele esteja implicado em alguma via da carcinogênese. Torna-se necessário, então, que se avalie a forma de interação com o mRNA-alvo, o resultado em termos de expressão de proteínas e, também, sua relação com mutações dos genes que os transcreveram (KENT; MENDELL, 2006).

Para que um miRNA seja caracterizado como oncomiR ou como miRNA supressor tumoral é necessário que coexistam, pelo menos, quatro condições: a demonstração de desregulação do miRNA em diversos tipos de câncer; a demonstração de deleção, amplificação ou de mutação que implique em ganho ou perda de função do miRNA; a comprovação em modelos experimentais da promoção ou da supressão de vias específicas da carcinogênese e, por fim, a

identificação dos alvos carcinogênicos específicos alterados a partir da desregulação do miRNA (KENT; MENDELL, 2006).

Destarte, dispõe-se de robusto corpo de evidência científica a demonstrar a existência de diferentes perfis de expressão de miRNAs entre os mais variados tipos de câncer quando comparados aos seus correspondentes tecidos normais. Ademais, é importante destacar que, além de assumirem um papel de biomarcadores diagnósticos para diversos tipos de câncer, os diferentes perfis de miRNAs também permitem estabelecer relações de prognóstico e predição de resposta a intervenções terapêuticas específicas, conforme demonstrado no Quadro 2 (CALIN; CROCE, 2006; PICHLER; CALIN, 2015; CHAKRABORTY; DAS, 2016).

Quadro 2 – Exemplos de estudos que apontaram miRNAs como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta a drogas.

Propósito	MiRNA(s)	Tipo de câncer	Amostra	Referência
Rastreo	Painel 13 miRNAs (miR-Test)	Pulmão	Soro	Montani et al. (2015)
Diagnóstico	Painel 24 miRNAs	Rim	Tecido	Spector et al. (2013)
Diagnóstico	Painel 3 miRNAs (miR-21, miR-31 e miR-210)	Pulmão	Escarro	Xing et al. (2015)
Diagnóstico	Painel 8 miRNAs (miR-106a, miR-125a-5p, miR-129-3p, miR-205, miR-21, miR-29b, miR-375 e miR-7)	Pulmão	Tecido	Gilad et al. (2012)
Diagnóstico	Painel 5 miRNAs (miR-30a, miR-30e, miR-152, miR-192 e miR-221)	Mama	Plasma	Fang et al. (2018)
Diagnóstico	Painel 64 miRNAs	Câncer de sítio primário desconhecido	Tecido	Meiri et al. (2012)
Diagnóstico	Painel 48 miRNAs	Câncer de sítio primário desconhecido	Tecido	Rosenfeld et al. (2008)
Prognóstico	miR-224	Colorretal	Tecido	Ling et al. (2015)
Prognóstico	miR-200a	Colorretal	Tecido	Pichler et al. (2014)

Continua

Conclusão

Propósito	MiRNA(s)	Tipo de câncer	Amostra	Referência
Prognóstico	Let-7i, miR-10b, miR-885-5p	Colorretal	Tecido	Hur et al. (2015)
Prognóstico	miR-155	Linfoma	Células	Iqbal et al. (2015)
Preditivo	miR-212	Cabeça e pescoço	Tecido	Hatakeyama et al. (2010)
Preditivo	Sítio de ligação Let-7 no gene KRAS	Colorretal	Tecido e sangue	Zhang et al. (2010)

Fonte: Pichler e Calin (2006); Fang et al. (2018)

A utilização de miRNAs para o diagnóstico de câncer já encontra aplicabilidade prática no que concerne ao diagnóstico do local de origem entre pacientes com cânceres de sítio primário desconhecido. Meiri et al. (2012) descreveram a validação de um painel de 64 miRNAs capaz de identificar 42 tipos de tumor primário, através do método de microarranjo. Neste estudo, os autores obtiveram uma sensibilidade de 85% após análise de 509 amostras cujos tumores primários eram conhecidos e uma concordância de 88% com 52 casos de tumores de sítio primário desconhecido, utilizando-se como referência teste anterior com 48 miRNAs identificados por qRT-PCR.

A despeito dos resultados promissores da utilização de miRNAs como biomarcadores diagnósticos, prognósticos, preditivos e, também, como potenciais alvos terapêuticos, percebem-se alguns obstáculos à sua utilização na prática clínica. O primeiro deles, refere-se ao fato de que a grande maioria dos resultados são obtidos através da análise de coortes retrospectivas e de banco de dados; dessa forma, sujeitos a vieses de seleção. Outro empecilho reside na grande heterogeneidade intratumoral da distribuição de moléculas, inclusive de miRNAs que pode implicar em erros de interpretação e na reprodutibilidade dos testes (PICHLER; CALIN, 2015).

2.4 OS miRNAs E O CÂNCER DE MAMA

Conforme anteriormente descrito, as ferramentas para o diagnóstico precoce do câncer de mama *in vivo* incluem, basicamente, a mamografia e a ultrassonografia das mamas. Contudo, existem algumas limitações técnicas relacionadas à acurácia dos métodos como a densidade das mamas e a detecção de calcificação, por exemplo. A ressonância nuclear magnética das mamas

tem sido proposta como modalidade complementar ao diagnóstico dessa doença, embora ainda apresente limitações quanto à sua sensibilidade e ao alto custo.

Atualmente, na prática clínica dos consultórios de oncologia, têm sido empregados alguns testes genéticos para o câncer de mama baseados em análise do mRNA para auxílio diagnóstico, prognóstico e na tomada de decisão terapêutica, sobretudo no que tange à prescrição ou não de quimioterapia para as pacientes. São eles: o PAM50, baseado na tecnologia NanoString; o MammaPrint, o Oncotype-DX e o EndoPredict, baseados na tecnologia do qRT-PCR (FAYANJU; PARK; LUCCI, 2018).

A despeito desses avanços, o diagnóstico precoce do câncer de mama ainda requer a utilização de testes desagradáveis e invasivos o que, de certa forma, limita a sua aplicabilidade. Nesse sentido, o isolamento e a caracterização de miRNAs circulantes como biomarcadores com potencial diagnóstico para essa doença representariam uma estratégia menos invasiva e, talvez, mais específica para o rastreamento e para o diagnóstico precoce do câncer de mama (BERTOLI et al., 2015).

É sabido que entre os mais variados tipos de câncer ocorre uma desregulação na expressão de miRNAs específicos que podem estar superexpressados ou suprimidos, seja no tecido tumoral ou circulantes. A utilização do método de microarranjos tem permitido identificar sequências de miRNAs que se encontram alteradas nos mais variados tipos de câncer (LU et al., 2005).

Diversos estudos têm procurado identificar entre os miRNAs, aqueles que mais se encontram desregulados em pacientes com câncer de mama, quer no tecido tumoral ou circulantes em fluidos corpóreos como o soro e o plasma, e, também, aqueles dotados de maior especificidade para o diagnóstico dessa doença. No mesmo sentido, busca-se ainda identificar o mecanismo carcinogênico relacionado a cada miRNA desregulado.

Iorio et al. (2005) demonstraram a existência de um perfil de expressão de miRNAs diferente entre o tecido mamário normal e o neoplásico. Após analisarem 76 amostras teciduais de câncer de mama, observaram que os miRNAs 121b, 21, 145 e 155 apresentavam-se superexpressados em comparação com o tecido mamário normal.

À medida em que se aumentava o número de miRNAs envolvidos na patogênese das mais variadas doenças e que se descobria o seu sequenciamento, função, alvos envolvidos, ligações com proteínas e mutações associadas, tornava-se necessário o surgimento de abordagens de bioinformática para o processamento e o arquivamento dessas informações. São exemplos desses repositórios: o mirBase, relacionado à nomenclatura e ao sequenciamento; o mirTarBase, concernente aos alvos dos miRNAs; o mirCancer e o SomamiR, referentes às

associações com os tipos de câncer, as vias da carcinogênese envolvidas e com as mutações germinativas ou somáticas relacionadas (MOORE; WINKJER; TSEN, 2015).

Bertoli et al. (2015) realizaram uma revisão dos estudos que apontavam certos miRNAs, identificados em tecido tumoral, sangue, plasma ou no soro, como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta a tratamentos específicos para o câncer de mama. Na sequência, estabeleceram uma relação entre cada miRNA desregulado e as vias da carcinogênese envolvidas, conhecidas como marcas do câncer, e descritas por Hanahan e Weinberg (2011). A Figura 4 demonstra as marcas do câncer e os respectivos miRNAs a elas associados.

A despeito da identificação, cada vez maior, de miRNAs com expressão aberrante em tecidos e/ou circulantes em diversos fluidos corporais, percebe-se uma grande discrepância entre as assinaturas de miRNA descritas (BERTOLI et al., 2017). Isso, provavelmente, reflete a heterogeneidade intrínseca das variantes clínicas, patológicas e moleculares do câncer de mama.

Recentemente, Grimaldi e Inconorato (2019) realizaram uma revisão sistemática para analisar o papel diagnóstico dos miRNAs circulantes em pacientes com neoplasia maligna da mama levando em consideração suas especificidade e consistência de expressão no tecido e no sangue. Motivados pela grande heterogeneidade das assinaturas de miRNAs com potencial diagnóstico para o câncer de mama publicadas até então e, conseqüentemente, pela dificuldade de incorporação na prática clínica dos miRNAs como biomarcadores diagnósticos dessa doença, eles analisaram o banco de dados do *Human miRNA Disease Database* (HMDD v3.0), repositório de miRNAs associados ao desenvolvimento e progressão de inúmeras doenças, e os estudos publicados no PubMed, no sentido de identificarem os miRNAs com potencial de compor uma ferramenta diagnóstica útil na prática clínica.

Tabela 1 – Descrição de miRNAs analisados no tecido e na corrente sanguínea no mesmo estudo.

Amostra	miRNAs analisados	Concordância	Pacientes (N)	Método	Referência
Soro	miR-21, miR-155, miR-106a, miR-126, miR-199, miR-335	Sim	68: tumor 68: soro CM 40: soro-controles	RT-qPCR	Wang et al. (2010)
Soro	miR-122	Sim	25: tumor 63: soro CM 50: soro-controles 20: soro DMB	SOLiD sequencing/ RT-qPCR	Wu et al. (2012)
Soro	miR-15b, miR-16, miR-17, miR-25, miR-93, miR-107, miR-185, miR-199a-5p	Sim	32: tumor 32: soro CM 22: soro-controles 132: soro CM 101: soro-controle	LNA RT-PCR human miRNA panels (Exiqon)/ RT-qPCR	Chan et al. (2013)
Soro	miR-21, miR-92a	Sim	48: tumor 100: soro CM 20: soro-controle	RT-pPCR	Yang et al. (2016)
Soro	miR-205, miR-155	Sim	48: tumor 100: soro CM 10: soro-controle	Microarray Chip/ RT-qPCR	Liu et al. (2013)
Soro	Let-7c	Sim	90: soro CM 64: soro-controle	RT-qPCR	Li et al. (2015)
Soro	miR-182	Sim	3: tumor 46: soro CM 58: soro-controle	RT-qPCR	Wang et al. (2013)
Soro	miR-21, miR-221, miR-210, let7a, miR-195, miR-145	Sim	85: tumor 85: soro CM 85: soro-controle 15: DMB 15: soro DMB	RT-qPCR	Thakur et al. (2016)

Continua

Continuação					
Amostra	miRNAs analisados	Concordância	Pacientes (N)	Método	Referência
Soro	miR-195: soro, miR-195 tumor	Não	96: tumor 96: soro CM 12: soro-controle	RT-qPCR	Cecene et al. (2016)
Soro	miR-139	Sim	74: tumor 18: soro CM 10: soro-controle	RT-pPCR	Dai et al. (2017)
Soro	miR-21-5p, miR-21-3p, miR-99a-5p	Sim	409: tumor 87: tecido mamário 113: soro CM 47: soro-controle	RT-qPCR	Yu et al. (2018)
Plasma	miR-181a, miR-652, miR-223 (plasma)/ miR-181a, miR-652 (tumor)	Não	11: tumor 54: plasma CM 56: plasma-controle	TacMan human miRNA arrays/ RT-qPCR	McDermott et al. (2014)
Plasma	miR-505-5p, miR-125b-5p, miR21-5p, miR-96-5p (plasma)/ miR21-5p, miR-96-5p, miR-505-5p, miR-125b-5p (tecido)	Parcialmente	122: tumor 11: tecido mamário 83: plasma CM 26: plasma-controle	LNA-based miRNA microarrays	Matamala et al. (2015)
Plasma	miR-21, miR-146a, miR-210 (plasma)/ miR-21, miR-146a, miR-200c, miR-210 (tumor)	Parcialmente	89: tumor 30: tecido não-tumoral 55: plasma CM 20: plasma-controle	RT-qPCR	Markou et al. (2016)

Continua

Continuação

Amostra	miRNAs analisados	Concordância	Pacientes (N)	Método	Referência
Plasma	miR-145, miR-451	Sim	5: tumor 245: plasma CM 155: plasma- controle	TaqMan Array Human miRNA Panels A and B/ RT- qPCR	Ng et al. (2013)
Plasma	Let-7, miR-195 (plasma)/ Let-7, miR-195 (tumor)	Não	In silico (TGCA) database 57: plasma- luminal 36: plasma triplo-negativo 33: plasma- controle	miScript miRNA PCR Array/ RT-qPCR	Qattan et al. (2017)
Plasma	miR-105, miR93-3p	Sim	In silico (Metabric) database/ dataset 13: tumor triplo- negativo 13: tecido mamário 12: tumor não- triplo negativo 74: plasma triplo negativo 12: plasma- controle 44: plasma não-triplo negativo	RT-qPCR	Li et al. (2017)

Continua

					Conclusão
Amostra	miRNAs analisados	Concordância	Pacientes (N)	Método	Referência
Plasma e Soro	miR-106a-5p e miR-20b-5p	Sim	200: plasma CM 200: plasma-controle 204: soro CM 202: soro-controle 32: tecido mamário	RT-qPCR	Li et al. (2018)
Sangue total	miR-195	Sim	65: tumor 83: sangue, soro e plasma CM 44: sangue, soro e plasma-controle	RT-qPCR	Haneghan et al. (2010)

miRNAs em negrito estão superexpressos e os demais, suprimidos. CM: câncer de mama. DMB: doença mamária benigna.

Fonte: adaptado de Grimaldi e Inconorato (2019)

A relação da expressão de vários miRNAs, quer no tecido tumoral ou circulante, com variáveis clínico-patológicas que, atualmente, são utilizadas para predizer o melhor ou pior comportamento biológico do câncer de mama permite atribuir um potencial prognóstico a esses biomarcadores (LOWERY et al., 2008).

Nesse sentido, o microRNA-21 tem sido o a molécula mais estudada e sua superexpressão tem sido associada a sobrevidas livre de doença e global reduzidas, a maior acometimento linfonodal regional e a estágios mais avançados da doença ao diagnóstico inicial. Outros miRNAs como o miRNA-210 e o miRNA-9, também superexpressos, relacionam-se a recidivas precoces e pior sobrevida, de maneira análoga à descrita para o miRNA-21 (NASSAR; NASR; TALHOUK, 2017).

Em sentido contrário, os miRNAs 30 e let-7b quando superexpressos, quer no tecido tumoral ou circulante em soro e plasma, associam-se a tumores menos agressivos, em estágios mais precoces, com menor acometimento linfonodal regional e melhores sobrevidas livre de doença e global (ABOLGHASEMI et al., 2019).

Percebe-se, portanto, que os miRNAs representam uma classe promissora de moléculas capazes de serem traduzidas em ferramentas diagnósticas não-invasivas para o câncer e para

tantas outras doenças. Permitem, ainda, que se estabeleçam relações com o prognóstico, com a predição de resposta a certos tratamentos e, também, podem representar alvos para o tratamento do câncer e de outras patologias.

2.5 OS MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS miRNAs

Os miRNAs circulantes são considerados estáveis por natureza: no soro, não são degradados por RNase e outras condições como pH alto ou baixo, armazenamento prolongado, aumento de temperatura e vários ciclos de descongelamento (CHAKRABORTY; DAS, 2016).

Os níveis de miRNAs circulantes são geralmente baixos e podem ser influenciados pelo tipo de amostra e pelo método de extração do RNA. Apesar de todos os fluidos corporais poderem conter miRNAs circulantes, são utilizados com maior frequência o soro e o plasma. Nesse sentido, é importante frisar que a hemólise é capaz de afetar a quantidade de miRNA circulante e, dessa forma, amostras com hemólise evidente devem ser excluídas. Ademais, levando-se em consideração que os miRNAs encontram-se ligados a proteínas, em corpos apoptóticos ou em exossomos, nos processos de extração de miRNA, devem-se escolher aqueles capazes de remover todo RNA presente na amostra, como o reagente TRIzol e as técnicas baseadas em coluna (HAMAM et al., 2017).

Vários métodos são descritos para a detecção de miRNAs e todos eles são dotados de vantagens e desvantagens. O método do qRT-PCR é amplamente utilizado e é considerado um método altamente sensível e que requer uma quantidade de entrada de miRNA muito pequena. Contudo, é capaz de detectar uma quantidade limitada, cerca de 700, de miRNAs específicos. As plataformas de microarranjos têm como vantagem a capacidade de identificar um grande número de miRNAs simultaneamente e de, também, requererem uma pequena quantidade de entrada dessas moléculas. Sua desvantagem inclui a incapacidade de identificar miRNAs não catalogados (KROH et al, 2010; REMACLE; HAMELS; LONGUEVILLE, 2006).

Já o sequenciamento de nova geração permite a detecção de miRNAs já catalogados e de novas moléculas de miRNA; entretanto, necessita de uma quantidade bem maior de material de entrada e gera uma quantidade enorme de dados que, para análise, requerem o uso de ferramentas de análise de bioinformática complexas. Por fim, a plataforma NanoString nCounter apresenta a vantagem de poder detectar a exata quantidade de cópias de várias espécies de miRNA na amostra biológica utilizada, através do emprego de tecnologia de código de barras molecular digital. Todavia, somente é capaz de identificar cerca de 800 miRNAs por amostra (GIT et al., 2010; MESTDAGH et al., 2014).

Pelos motivos supracitados, a escolha de que método selecionar dependerá do tipo de amostra, da pergunta que se pretende responder, da disponibilidade de equipamentos e da quantidade de recursos disponíveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o nível de expressão dos miRNA-21, miRNA-155 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres com diagnóstico de neoplasia maligna da mama em relação aos seus controles saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Verificar o nível de expressão dos miRNA-21, miRNA-155 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres com diagnóstico de câncer de mama e submetidas, ou não, à quimioterapia neoadjuvante em relação aos seus controles saudáveis.

3.2.2 Correlacionar o nível da expressão tecidual e sérica dos miRNA-21, miRNA-155 e miRNA-195 com variáveis clínico-patológicas do câncer de mama, a saber: tamanho do tumor, estadiamento TNM, grau histopatológico do tumor, subgrupo molecular do câncer de mama e acometimento linfonodal axilar.

4. RESULTADOS

4.1. ARTIGO ORIGINAL 1 - Avaliação do nível de expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama
Artigo ainda não submetido à análise para publicação.

Autores:

Alexandre Cesar Vieira de Sales ^{1,2}
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva ¹
Matheus Carvalho Brito Leite ¹
Leandro de Lima Coutinho ¹
Renata Bezerra de Albuquerque Cavalcante Reis ¹
Danyelly Brunaska Gondin Martins ¹
José Luiz de Lima Filho ¹
Fabrício de Oliveira Souto ^{1,2}

Afiliação e endereço dos autores:

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 52171-011, Recife-PE, Brasil.

² Núcleo de Ciências da Vida – NCV, Centro Acadêmico do Agreste – CAA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Marielle Franco s/n, Nova Caruaru, Caruaru, 55014-900, Caruaru-PE, Brasil.

Título

Avaliação do nível de expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama.

Correspondências para o autor:

Alexandre Cesar Vieira de Sales

ORCID: 0000-0002-3085-7967

e-mail: ac.sales@uol.com.br

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP 52171-011

Phone/FAX: +55 (81) 2126-8484

Resumo

Introdução: O câncer de mama corresponde à neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres e, no Brasil, é diagnosticado em estágios mais avançados da doença. Diversos miRNAs encontram-se desregulados no tecido tumoral e nos fluidos corporais e têm sido apontados como biomarcadores com potencial diagnóstico, prognóstico e também de predição de resposta a determinado tratamento. **Objetivo:** Analisar a expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama e correlacioná-las com a resposta à quimioterapia neoadjuvante e com variáveis clinicopatológicas dessa doença. **Método:** A expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 foi avaliada por qRT-PCR em fragmentos de tecido tumoral e no soro de mulheres com diagnóstico de câncer de mama e comparadas com amostras biológicas correspondentes de controles saudáveis. Estabeleceu-se, então, correlação da expressão dessas moléculas com exposição à quimioterapia neoadjuvante e com as seguintes variáveis clinicopatológicas: tamanho tumoral, estadiamento TNM, grau histopatológico, subgrupo molecular da doença e acometimento linfonodal axilar. **Resultados:** Foram observados níveis aumentados da expressão do miRNA-21 e suprimidos da expressão do miRNA-195 no tecido tumoral das pacientes com câncer de mama, independentemente da exposição prévia à quimioterapia. Não houve diferença significativa na expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 no soro das pacientes com câncer de mama em relação aos controles. A correlação da expressão tecidual dos miRNA-21 e miRNA-195 com as variáveis clinicopatológicas analisadas acompanhou, em linhas gerais, o mesmo padrão observado dessas moléculas para todo o grupo de pacientes com câncer de mama: superexpresso e suprimido, respectivamente. **Conclusão:** O miRNA-21 e o miRNA-195 se mostraram significativamente desregulados no tecido tumoral das pacientes com câncer de mama, independente de tratamento prévio com quimioterapia. Não houve diferença significativa na expressão desses miRNAs no soro das pacientes doentes em comparação aos seus controles. Assim, o papel de biomarcadores diagnósticos e/ou prognósticos dessas moléculas no soro de pacientes com câncer de mama não pode ser confirmado, ao menos neste estudo.

Palavras-chave: Câncer de mama. miRNA-21. miRNA-195. tecido tumoral. Soro.

Introdução

O câncer de mama corresponde à neoplasia mais comum entre as mulheres e, anualmente, estima-se uma média de 2,1 milhões de casos novos da doença em todo o mundo

(FERLAY et al., 2019). No Brasil, o número de novos casos dessa doença previsto para o biênio 2018-2019, segundo o Instituto Nacional de Câncer – INCA, foi de 59.700 ao ano, com risco estimado de 56,3 casos para cada 100.000 mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A despeito dos inúmeros avanços obtidos nas últimas décadas, sobretudo no que tange à melhor estratificação das pacientes de acordo com características oncogênicas do câncer de mama e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas para cada subgrupo, ainda se carece do aperfeiçoamento de ferramentas mais custo-efetivas para o diagnóstico da doença. Ademais, torna-se necessário investigar novos biomarcadores que, aliados aos parâmetros clinicopatológicos convencionais, sejam capazes de identificar subgrupos de pacientes com pior prognóstico e de predizerem maiores benefícios a modalidades terapêuticas específicas (CHEN; WANG, 2014).

Os microRNAs, ou miRNAs, são pequenas moléculas de RNA formadas por 19 a 23 nucleotídeos capazes de regular a expressão gênica em um nível pós-transcricional e, dessa forma, exercerem um importante papel de controle da fisiologia celular à medida que atuam em processos como metabolismo, proliferação e diferenciação celulares, além de apoptose (VICHNOI; RANI, 2017). Dessa forma, a desregulação da expressão de miRNAs tem sido associada a um amplo espectro de patologias como doenças autoimunes, doença de Parkinson, demência de Alzheimer, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (SHAH; HUTCHINSON; KAKAR, 2009).

Existem um robusto corpo de evidências científicas de que os miRNAs encontram-se desregulados em pacientes com os mais variados tipos de câncer e que podem se mostrar superexpressos e promovendo vias específicas da carcinogênese, sendo denominados “oncomiRs” ou suprimidos, atuando como supressores tumorais, no tecido tumoral ou em diversos fluidos corporais como sangue, urina, saliva, suor, líquido, sêmen e leite materno. Os miRNAs circulam nesses fluidos ligados a vesículas lipídicas ou exossomos, o que lhes confere estabilidade ao lhes proteger da ação de RNases (CALIN; CROCE, 2006; CORTEZ et al., 2011; GANTIER et al., 2011).

Muitos estudos têm sido conduzidos no intuito de identificar a expressão anormal de miRNAs circulantes em pacientes com câncer de mama (CHAN et al., 2013; HAMAM et al., 2017; MISHRA et al., 2015; NASSAR et al., 2017). Contudo, a identificação de assinaturas de miRNAs circulantes associadas ao câncer de mama não tem se traduzido em aplicabilidade na prática clínica por conta da extensa heterogeneidade na seleção dos miRNAs mais adequados, em termos de sensibilidade e de especificidade, para compor potenciais painéis diagnósticos e/ou prognósticos; das características genéticas das populações estudadas; do sexo; da idade;

de características metabólicas e dos desafios metodológicos relacionados a reprodutibilidade dos testes (GRIMALDI; INCONORATO, 2019).

Em recente revisão, Grimaldi e Inconorato (2019) avaliaram o papel dos miRNAs descritos como biomarcadores diagnósticos levando em consideração suas validades clínicas e nível de expressão consistentemente desregulado entre tecido tumoral e sangue. Concluíram, então, que o miRNA-21-5p figura entre os miRNAs mais validados para composição de painéis diagnósticos para o câncer de mama, mostrando-se superexpresso no tecido tumoral e no sangue, porém com limitado potencial discriminatório entre essa doença e outras neoplasias malignas. Já o miRNA-195 foi apontado, nesta revisão, como um dos miRNAs mais específicos e, portanto, capaz de diferenciar o câncer de mama de outras neoplasias malignas e de lesões benignas da mama.

O microRNA-21-5p corresponde a um dos microRNAs mais superexpressos em câncer de mama, tanto no tecido tumoral quando circulante no sangue, e é capaz de inibir vários genes supressores tumorais como, por exemplo, o PTEN e o PDCD-4. Dessa forma, atua promovendo o crescimento tumoral, a capacidade de invasão e de metástase (HAMAM et al., 2017). Ademais, em metanálise conduzida por Wu et al (2015), apontou-se esse miRNA como biomarcador efetivo para o reconhecimento precoce de vários tipos de câncer em estágio inicial.

O miRNA-195, considerado um miRNA supressor tumoral, corresponde a uma molécula que atua em produtos do gene BCL2 – que regula a apoptose celular – e que foi apontada como biomarcador circulante de maior especificidade para o diagnóstico de câncer de mama, sobretudo quando analisado em combinação com a expressão do microRNA-155. Ademais, existe certa controvérsia na literatura acerca da expressão dessa molécula no soro e no plasma, onde esse miRNA é relatado como superexpresso, em alguns estudos, e suprimido em outros (CECENE et al., 2016; HENEGHAN et al., 2010; QATTAN et al., 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o nível da expressão dos miRNA-21-5p e miRNA-195-5p no tecido tumoral e no soro de uma coorte de mulheres brasileiras com o diagnóstico de câncer de mama, submetidas ou não à quimioterapia neoadjuvante e, também, de correlacioná-las a algumas características clinicopatológicas da doença.

Pacientes e Métodos

Aspectos éticos

Todas as mulheres participantes deste estudo concederam autorização escrita mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a utilização de suas

amostras biológicas para os objetivos descritos nesta pesquisa, que foi submetida a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital do Câncer de Pernambuco (CAAE: 75061717.3.0000.5205). Foram seguidos os preceitos da Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde e os termos descritos na Declaração de Helsinki.

Composição da amostra

Foram incluídas 55 pacientes portadoras de câncer de mama e submetidas a tratamento cirúrgico com intuito curativo no Hospital do Câncer de Pernambuco, entre os meses de maio e julho de 2018. Ressalta-se que 28 dessas 55 mulheres foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante com protocolos de tratamento selecionados a critério do médico oncologista assistente.

Os critérios de inclusão neste estudo foram: idade maior que 18 anos, comprovação histopatológica de neoplasia maligna da mama e estadiamento Tumor-Linfonodo-Metástase (TNM) entre os estádios I a III, inferindo uma doença localizada. Os critérios de exclusão consistiam em diagnóstico prévio de neoplasia malignas, de doenças neurológicas degenerativas (demência de Alzheimer e doença de Parkinson) e de doenças autoimunes, além da presença de hemólise macroscópica no soro.

As características clinicopatológicas e sociodemográficas das pacientes incluídas no estudo foram armazenadas em banco de dados gerenciado pelo pesquisador principal. O estadiamento do câncer de mama foi realizado utilizando-se os critérios descritos na 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer* TNM (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018) e os subgrupos moleculares do câncer de mama foram definidos de acordo com as características imunoistoquímicas afetas à expressão de receptores de estrogênio, de progesterona, da oncoproteína Her-2 e do índice de proliferação celular Ki-67 (GOLDHINSCH et al., 2011). Nos casos duvidosos para a expressão imunoistoquímica do Her-2, lançou-se mão da análise da amplificação dessa molécula através da técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH).

O grupo controle foi representado por fragmentos de tecido mamário saudável de nove mulheres, sem relato de comorbidades clínicas, submetidas à cirurgia plástica para fins estéticos em hospitais privados da cidade do Recife e pelo soro de 12 mulheres saudáveis, voluntárias e colaboradoras do Hospital do Câncer de Pernambuco.

Coleta e processamento do material biológico

Uma amostra simples de 5mL de sangue das mulheres com diagnóstico de neoplasia maligna da mama e também dos indivíduos do grupo controle foi coletada em tubo de ensaio para sorologia VACUETTE® 8mL com ativador de coágulo e com gel separador 16x100 (Greiner Bio-One Pré-analítico, Americana-SP, Brasil). Após coletado, deixou-se o sangue coagular a temperatura ambiente por 30 minutos. Na sequência, o sangue foi centrifugado por 10 min, a 5000rpm em temperatura ambiente. O soro resultante foi então armazenado em freezer -80°C, em duas alíquotas de 1mL em microtubos de centrifugação do tipo Eppendorf.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, realizavam-se incisões na peça cirúrgica no intuito de identificar o tumor ou o seu leito tumoral (no caso de tumores que haviam desaparecido macroscopicamente após tratamento sistêmico neoadjuvante). Então, retirava-se um fragmento tecidual de, no mínimo, 0,5x0,5cm que era alocado em tubo plástico hidrofóbico contendo 1mL de solução para preservação de ácidos nucleicos, RNAlater™ (Qiagen). Esse material foi estocado em freezer -20°C por até 72h e, posteriormente, armazenado em freezer -80°C em microtubos de centrifugação do tipo Eppendorf.

Extração do RNA do soro

O RNA dos soros das mulheres incluídas no estudo foi isolado com a utilização do kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. Na sequência, os RNAs foram quantificados no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop) e tratados com 2U de *Ambion® DNase* (Life Technologies) para um volume de 50µL, em observâncias às recomendações do fabricante.

Extração do RNA tecidual

Após descongelado, 50 a 100mg do tecido tumoral eram fragmentados com lâmina de bisturi e colocados em tubo de 15mL ao qual se acrescentou 1mL de TRIzol® (*Invitrogen, Life Technologies*) e, em seguida, foram homogeneizados no homogeneizador Polytron. Após incubação em temperatura ambiente por cinco minutos, acrescentou-se 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de TRIzol® utilizado e agitou-se o tubo, vigorosamente, no vortex por 15 segundos. Após incubação à temperatura ambiente por cinco minutos, o material foi

centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante incolor foi transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou 0,5mL de isopropanol. Esta solução ficou incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, foi centrifugada a 12000xg a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado de modo a se obter o *pellet* de RNA no tubo e, em seguida, acrescentou-se 1mL de etanol 75% e agitou-se a solução no vortex por 15 segundos. Esse passo foi repetido mais uma vez para garantir que o RNA estivesse livre de contaminação com os reagentes usados na extração. Após a segunda lavagem com etanol 75%, o sobrenadante foi desprezado e o tubo ficou sobre a bancada aberto por alguns minutos para a secagem do pellet. O RNA foi, então, diluído em 30uL de água tratada com DEPC (Diethyl pirocarbonato – Sigma) e, posteriormente, armazenado em freezer a – 80°C. A quantificação do RNA foi feita no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop).

Síntese de cDNA e expressão gênica

Após a extração do RNA, foi realizada a quantificação e avaliação da pureza utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). O RNA total foi estocado em freezer -80°C para uso posterior. A síntese de cDNA dos miRNAs foi realizada a partir de 10ng de material utilizando-se o TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) e 5X RT Primer respectivos (miR-21-5p: Assay ID_000397; miR-195-5p: Assay ID_000494; miR-16-5p: Assay ID_000391; RNU6B: Assay ID_001093) seguindo as instruções do fabricante. A reação de síntese de cDNA foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA) cujo programa de ciclagem foi 16°C por 30 minutos seguidos de 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C de *hold*.

Todas as amostras foram submetidas a análise da expressão gênica através da *quantitative Real Time PCR analysis* (qRT-PCR) com o sistema TaqMan. A reação foi realizada utilizando TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), sonda 20X e água Milli-Q para um volume final de 10ul. As condições de amplificação foram realizadas de acordo com instruções do fabricante e cuja ciclagem se processou da seguinte forma: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, para ativação enzimática, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por um minuto (anelamento e extensão). Todas as amostras foram analisadas em triplicata utilizando-se a plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems, USA). O *Cycle quantification* (C_q) utilizado para todas as análises foi 0.5 e os níveis relativos dos miRNAs alvos (miR-21-5p e miR-195-5p) foram normalizados pela

expressão do microRNA-16 e snRNA RNU6B para as amostras de tecido e microRNA-16 para as amostras de soro utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Processamento de dados e análise estatística

Os valores da quantificação de ciclos ou *Cycle quantification* (Cq) dos miRNAs-alvo foram subtraídos dos valores de Cq dos controles endógenos (microRNA-16 e RNU6B), dando origem ao ΔCq . Na sequência, calculou-se o $\Delta\Delta Cq$ através da subtração do valor do ΔCq de cada amostra e da diferença das médias dos Cq do controle endógeno e de cada miRNA analisado. A etapa de normalização foi realizada de acordo com o $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os valores expressados são representados como valor do $\Delta\Delta Cq$ em uma escala \log_2 . Utilizou-se, ainda, um método quantitativo absoluto para comparação dos grupos a partir da média dos valores absolutos dos Cq dos miRNAs analisados. O procedimento de análise dos dados foi realizado no ambiente R (versão 3.1.1). A análise estatística foi realizada a partir da utilização de um teste não-paramétrico de Mann-Whitney U Test com um nível de significância estatística de $p \leq 0,05$.

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk e a variação de homogeneidade entre os grupos pelo teste de Levene. As variáveis numéricas foram apresentadas como média \pm desvio padrão e as variáveis categóricas, como frequências relativas. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o modelo linear generalizado. Quando se verificou significância estatística, estabelecida como valor de $p \leq 0,05$, realizou-se uma análise *post hoc* para comparações simples e correção de Bonferroni para múltiplas comparações.

Resultados

As características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama incluídas no estudo estão descritas na Tabela 1.

A média de idade das 12 mulheres que compuseram o grupo controle do soro foi de 46.8 ± 4.3 anos. No que tange aos controles teciduais, a média de idade foi de 37.8 ± 2.4 anos. É importante destacar para fins de análise dos dados que na distribuição dos subgrupos moleculares do câncer de mama, foram consideradas como Her-2 positivas 10 pacientes com tumores luminais híbridos e duas pacientes com tumores com Her-2 amplificado.

Houve a exclusão de cinco amostras de soro nas quais se observou hemólise macroscópica: duas amostras de pacientes com tumores Luminais A, duas amostras Luminais B e uma amostra Luminal híbrido. Realizou-se, então, análise da expressão relativa dos miRNA-21-5p e miRNA-195-5p nas 50 amostras de soro restantes (24 do grupo sem exposição à quimioterapia e 26 do grupo submetido a esse tratamento) e nos seus 12 controles sadios correspondentes. Utilizaram-se como genes de referência o RNU6B e o microRNA-16. Contudo, as curvas correspondentes ao RNU6B no soro se mostraram inconsistentes e, muitas vezes, indetectáveis. Dessa forma, utilizou-se o miRNA-16-5p como único normalizador endógeno para todas as análises realizadas nas amostras de soro.

Tabela 1 – Características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama.

Variáveis	Todos (n=55)	sQTNA (n=27)	QTNA (n=28)	P
Média ± desvio-padrão				
Idade (anos)	54,2±1,9	54,3±2,8	48,1±2,1	0,001
Tamanho patológico do tumor (cm)	3,44±0,31	4,00±0,44	2,89±0,41	0,087
Tamanho clínico do tumor (cm)	4,67±0,31	3,56±0,37	5,75±0,43	<0,001
Frequência n (%)				
Tipo histológico				0,589
Carcinoma tubular	2 (3,6)	2 (3,7)	-	
CINE	50 (91)	25 (92,6)	27 (96,4)	
Carcinoma lobular infiltrante	3 (5,4)	2 (3,7)	1 (3,6)	
Subgrupos moleculares				0,216
Luminal A	7 (12,7)	6 (22,2)	1 (3,6)	
Luminal B	28 (50,9)	12 (44,5)	16 (57,1)	
HER-2	12 (21,8)	5 (18,5)	7 (25,0)	
Tripla negativo	8 (14,6)	4 (14,8)	4 (14,3)	
Estadiamento TNM				0,002
Estadio I	9 (16,4)	8 (29,6)	1 (3,6)	
Estadio II	29 (52,7)	16 (59,3)	13 (46,4)	
Estadio III	17 (30,9)	3 (11,1)	14 (50,0)	
Grau histopatológico				0,338
Grau 1	4 (8,4)	3 (11,1)	1 (4,3)	
Grau 2	22 (45,8)	14 (51,9)	9 (39,1)	
Grau 3	22 (45,8)	10 (37,0)	13 (56,5)	
Linfonodos				0,995
0	35 (63,6)	17 (63,0)	18 (64,3)	
1 a 3	14 (25,5)	7 (25,9)	7 (25,0)	
≥ 4	6 (10,9)	3 (11,1)	3 (10,7)	

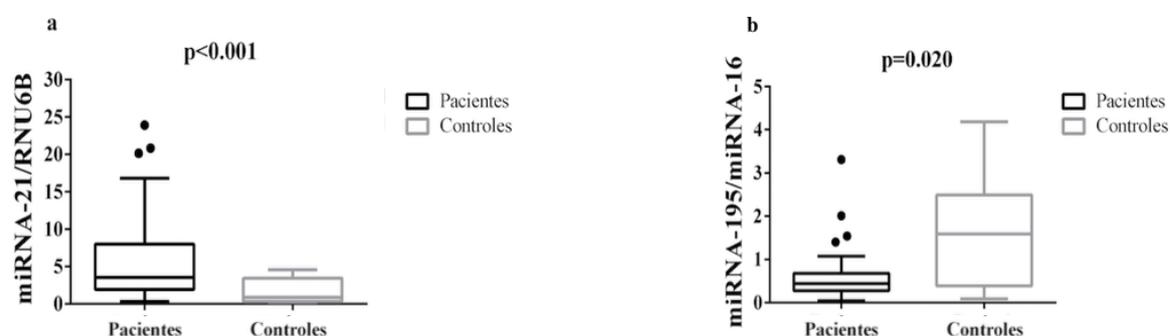
CINE: carcinoma invasivo não especial; CLI: carcinoma lobular infiltrante; QTNA: quimioterapia neoadjuvante; sQTNA: sem quimioterapia neoadjuvante.

Fonte: Tabela elaborada pelos próprios autores, 2019.

Expressão tecidual do miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p entre pacientes com câncer de mama e seus controles saudáveis.

O nível de expressão tecidual do miRNA-21-5p se mostrou estatisticamente maior no grupo das pacientes com câncer de mama em relação aos seus controles, utilizando-se como controle endógeno o RNU6B (Figura 1a). Ao se analisar o nível de expressão do miRNA-195-5p, observou-se uma significativa supressão dessa molécula no tecido tumoral das pacientes com câncer de mama em comparação ao grupo controle, utilizando-se como controle endógeno o miRNA-16-5p (Figura 1b).

Figura 1 – Expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 em tecido tumoral de câncer de mama. a. Expressão tecidual do miRNA-21. b. Expressão tecidual do miRNA-195.



Fonte: Próprios autores, 2019.

Expressão tecidual do miRNA-21-5p de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama e outros fatores prognósticos

A análise do nível de expressão do miRNA-21-5p no tecido tumoral dos diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama demonstrou superexpressão dessa molécula em todos os subtipos em comparação aos seus controles. Esses resultados foram mais marcantes para os subgrupos HER-2-positivo e Luminal A, nos quais se observou uma expressão relativa dessa molécula 3.4 vezes superior àquela do grupo controle. Embora entre as pacientes com tumores triplo-negativos tenha se observado uma expressão relativa do miRNA-21-5p 2.31 vezes maior que a observada entre os controles, não se identificou significância estatística. Quando esta mesma análise foi realizada a partir da comparação das médias dos valores absolutos dos Cq, observou-se uma diferença significativa quando à expressão do miRNA-21-5p para todos os subgrupos moleculares (Tabela 2).

Houve superexpressão dos níveis do miRNA-21-5p para todos os estágios do câncer de mama de acordo com a classificação TNM, em relação ao grupo controle. Ao se comparar os

diferentes estágios TNM do câncer de mama, utilizando-se a média dos valores absolutos dos Cq, verificou-se uma diferença mais pronunciada para o estágio III em comparação ao estágio II (Tabela 2).

No que tange ao grau histopatológico, notou-se uma significativa superexpressão dos níveis do miRNA-21-5p para os graus histológicos 2 e 3. Quando esta mesma análise foi realizada a partir da comparação das mdias dos valores absolutos dos Cq, identificou-se uma diferença significativa para todos os graus histológicos quando comparados ao grupo controle (Tabela 2)

Quando se comparou o nível da expressão do miRNA-21-5p de acordo com o acometimento linfonodal axilar, observou-se no grupo das pacientes com câncer de mama, uma superexpressão dessa molécula independentemente do status da axila (Tabela 2).

Não se observou uma correlação entre o tamanho do tumor e o nível de expressão do miRNA-21-5p (Figura 2)

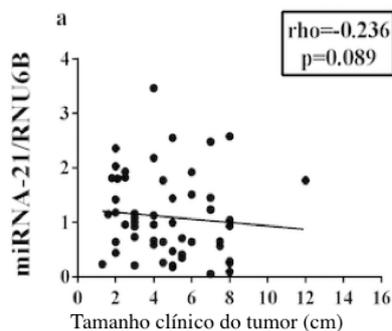
Tabela 2 – Expressão do miRNA-21 de acordo com fatores prognósticos do câncer de mama.

Fatores Prognósticos	miRNA-21/RNU6B	miRNA-21/Cq
Subgrupos moleculares		
Controles	1.76±0.50	25.0±1.0
Luminal A	6.03±1.89*	19.6±0.9*
Luminal B	3.60±0.61*	19.6±0.5*
HER-2	6.03±1.44*	20.1±0.7*
Triple-negativo	4.07±1.19	18.1±0.8*
<i>p-valor</i>	0.021	<0.001
Estadiamento TNM		
Controles	1.76±0.50	25.0±1.0
Estágio I	4.52±1.28*	19.2±0.8*
Estágio II	4.33±0.73*	19.0±0.4*
Estágio III	4.99±1.06*	20.6±0.6*†
<i>p-valor</i>	0.02	<0.001
Grau histológico		
Controles	1.76±0.50	25.0±1.0
Grau 1	4.35±2.11	19.4±1.1*
Grau 2	3.91±0.71*	19.8±0.5*
Grau 3	5.04±0.93*	18.5±0.4*
<i>p-valor</i>	0.019	<0.001
Acometimento linfonodal		
Controles	1.76±0.50	25.0±1.0
0	5.15±0.78*	19.9±0.4*
1 to 3	6.06±1.51*	18.8±0.6*
≥ 4	5.34±1.96	18.6±0.9*
<i>p-valor</i>	0.007	<0.001

Valores apresentados como média ± desvio padrão. *Diferença significativa em relação aos controles (p<0.05).

Fonte: Tabela elaborada pelos próprios autores, 2019.

Figura 2 – Correlação entre a expressão tecidual do miRNA-21 e o tamanho do tumor.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Expressão tecidual do miRNA-195-5p de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama e outros fatores prognósticos

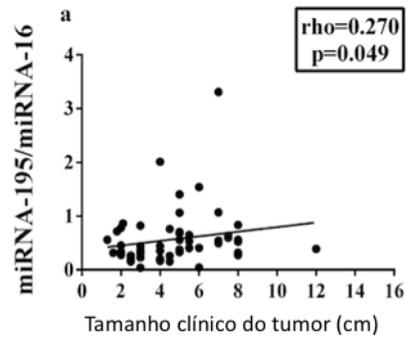
A análise do nível da expressão do miRNA-195-5p entre os diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama e seus controles demonstrou a supressão dos níveis dessa molécula para todos os subtipos, exceto para o HER-2 positivo. A redução do nível de expressão dessa molécula foi mais pronunciada entre o subgrupo de pacientes com tumores triplo-negativos. Ao se analisar o nível de expressão dessa molécula entre os subgrupos moleculares, percebeu-se uma diferença significativa entre os subtipos HER-2-positivo e triplo-negativo (Tabela 3).

A expressão do miRNA-195-5p entre os diferentes estágios TNM do câncer de mama revelou-se suprimida para todos os estágios da doença em comparação ao grupo controle (Tabela 3). Houve correlação entre o tamanho clínico do tumor e a expressão do miRNA-195-5p (Figura 3).

No que tange ao nível de expressão do miRNA-195-5p em relação aos diferentes graus histológicos do câncer de mama, observou-se supressão dessa molécula para todos os graus - embora tenha sido mais pronunciada para o grau 3 - em relação ao grupo controle. Quando se realizou uma análise intergrupo, notou-se uma diferença significativa entre os graus 3 e 2 (Tabela 3).

Quando se avaliou o nível de expressão dessa molécula de acordo com grau de acometimento linfonodal axilar, verificou-se uma significativa supressão do miRNA-195-5p para todas as pacientes com câncer de mama em relação aos controles, independentemente do status de acometimento axilar (Tabela 3)

Figura 3 – Correlação entre o tamanho clínico do tumor e a expressão tecidual do miRNA-195.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Tabela 3 – Expressão do miRNA-195 de acordo com fatores prognósticos do câncer de mama.

Fatores prognósticos	miRNA-195/miRNA-16
Subgrupos moleculares	
Controles	1.64±0.41
Luminal A	0.56±0.38*
Luminal B	0.44±0.41*
HER-2	0.61±1.40‡
Triple-negativo	0.31±0.28*
<i>p-valor</i>	<0.001
Estadiamento TNM	
Controles	1.64±0.41
Estágio I	0.44±0.11*
Estágio II	0.64±0.89*
Estágio III	0.52±0.90*
<i>p-valor</i>	<0.001
Grau histológico	
Controles	1.64±0.41
Grau 1	0.48±0.18*
Grau 2	0.71±0.11*
Grau 3	0.44±0.70*†
<i>p-valor</i>	<0.001
Acometimento linfonodal	
Controles	1.64±0.41
0	0.61±0.08*

Continua

Fatores prognósticos	miRNA-195/miRNA-16	Conclusão
1 to 3	0.50±0.10*	
≥ 4	0.50±0.15*	
	<i>p-value</i>	<0.001

Valores apresentados como média ± desvio padrão. *Diferença significativa dos controles ($p < 0.05$). ‡Diferença significativa do triplo-negativo ($p < 0.05$). †Diferença significativa do Grau 2 ($p < 0.05$).

Fonte: Tabela elaborada pelos próprios autores, 2019.

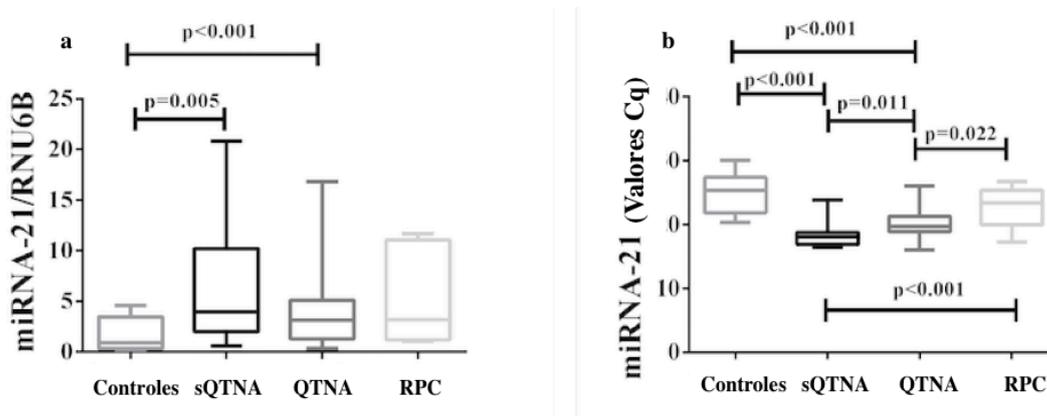
Expressão tecidual do miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p em pacientes com câncer de mama após exposição à quimioterapia neoadjuvante

As características clínicas das 28 pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante estão descritas na Tabela 1.

A média do tamanho do tumor antes do tratamento quimioterápico foi de 5.75 ± 0.41 cm e de 2.89 ± 0.41 cm, no espécime cirúrgico. Cinco das 28 pacientes submetidas à quimioterapia prévia obtiveram resposta patológica completa (RPC) na mama e na axila.

Ao se comparar o nível de expressão do miRNA-21-5p entre as pacientes com câncer de mama que não foram expostas à quimioterapia, as que realizaram quimioterapia neoadjuvante e as que obtiveram RPC, observou-se superexpressão dos níveis dessa molécula para os dois primeiros grupos em comparação ao grupo controle (Figura 4a). Quando esta mesma análise foi realizada a partir da média dos valores absolutos dos Cq de cada grupo, percebeu-se uma diferença significativa entre as pacientes que não foram expostas à quimioterapia e o grupo que recebeu esse tratamento. No grupo tratado, foram observados maiores valores de Cq (Figura 4b). Outrossim, nenhuma diferença quanto à expressão do miRNA-21-5p foi observada entre o grupo da RPC e o grupo controle em ambos os métodos de comparação utilizados (Figura 4a-b).

Figura 4 – Expressão tecidual do miRNA-21 de acordo com exposição à quimioterapia neoadjuvante.



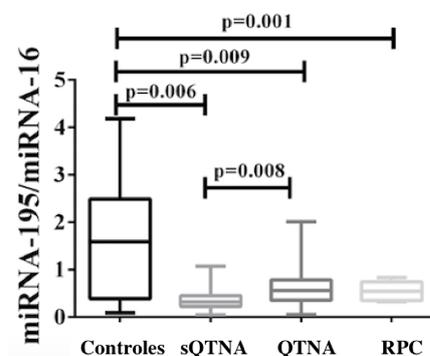
a. Expressão de miRNA-21 utilizando-se o RNU6B como gene de referência. **b.** Expressão de miRNA-21 utilizando-se a média dos valores absolutos dos Cq.

sQTNA: sem quimioterapia neoadjuvante; QTNA: quimioterapia neoadjuvante; RPC: resposta patológica completa.

Fonte: Próprios autores, 2019.

Quando se procedeu a análise do nível de expressão do miRNA-195-5p entre as pacientes que não foram expostas à quimioterapia, as que realizaram quimioterapia neoadjuvante e as que obtiveram RPC, observou-se uma supressão dessa molécula para todas as mulheres com diagnóstico de câncer de mama em relação ao grupo controle. Ademais e de forma análoga ao descrito para o miRNA-21-5p, percebeu-se uma significativa diferença na expressão do miRNA-195-5p entre as pacientes que não foram expostas à quimioterapia e o grupo que recebeu esse tratamento e que se apresentaram com níveis mais baixos e mais altos dessa molécula, respectivamente (Figura 5).

Figura 5 – Expressão tecidual do miRNA-195 de acordo com exposição à quimioterapia neoadjuvante.

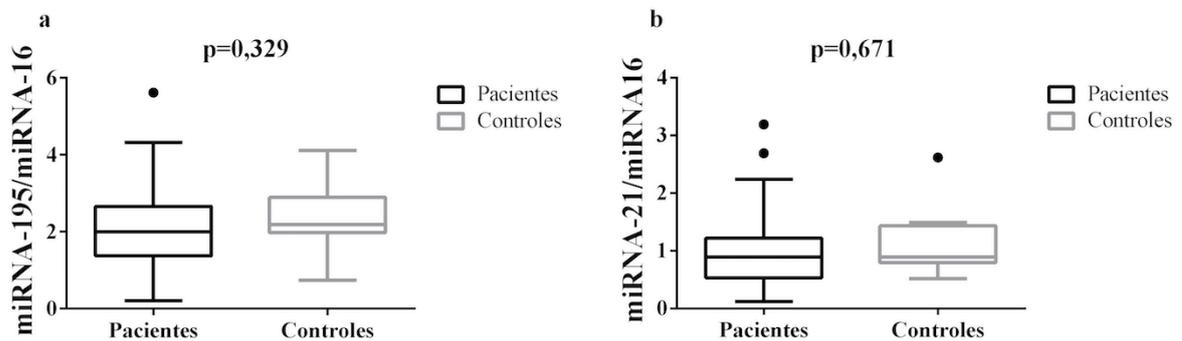


Fonte: Próprios autores, 2019.

Comparação da expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 entre pacientes com câncer de mama e seus controles saudáveis

A análise comparativa da expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 no soro de todas as pacientes com diagnóstico de câncer de mama demonstrou não haver diferença significativa em relação aos seus controles saudáveis (Figura 6).

Figura 6 – Expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 entre pacientes com câncer de mama.



a. Expressão sérica do miRNA-195. **b.** Expressão sérica do miRNA-21.

Fonte: Próprios autores, 2019.

Expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 de acordo com os subgrupos moleculares da doença e outras variáveis clinicopatológicas

Quando se analisou a expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 de acordo com os subgrupos moleculares da doença, o estadiamento TNM, grau histopatológico e acometimento linfonodal axilar, não se observou diferença significativa entre o soro das pacientes e seus controles saudáveis (Tabela 4).

Ademais, não se observou correlação entre o tamanho do tumor e a expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 (Figura 7).

Tabela 4 – Expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 de acordo com variáveis clinicopatológicas do câncer de mama.

Fatores prognósticos	miRNA-21/miRNA16	miRNA-195/miRNA16
Subgrupos moleculares		
Controles	1,10±0,20	2,44±0,38
Luminal A	0,74±0,17	2,17±0,43
Luminal B	0,98±0,12	2,00±0,20

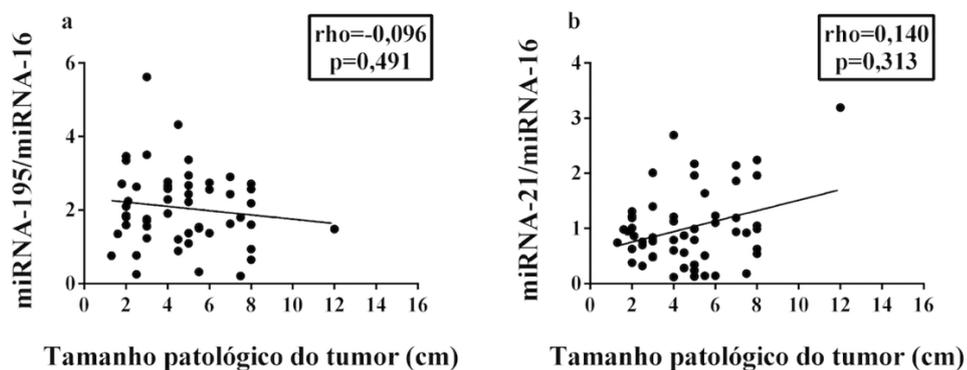
Continua

Fatores prognósticos	Conclusão	
	miRNA-21/miRNA16	miRNA-195/miRNA16
HER-2	1,42±0,26	1,83±0,27
Triplo negativo	0,73±0,16	2,48±0,46
<i>p-value</i>	0,093	0,587
Estadiamento TNM		
Controles	1,10±0,20	2,44±0,38
Estadio I	0,93±0,20	2,11±0,37
Estadio II	0,86±0,10	2,15±0,21
Estadio III	1,30±0,20	1,88±0,24
<i>p-value</i>	0,171	0,640
Grau histopatológico		
Controles	1,10±0,20	2,44±0,38
Grau 1	0,75±0,27	1,98±0,61
Grau 2	0,92±0,12	2,18±0,24
Grau 3	1,08±0,14	1,92±0,22
<i>p-value</i>	0,645	0,645
Linfonodos		
Controles	1,10±0,20	2,44±0,38
0	1,13±0,12	2,03±0,18
1 a 3	0,73±0,12	2,33±0,32
≥ 4	0,90±0,26	1,43±0,33
<i>p-value</i>	0,158	0,223

Valores são apresentados como média±erro-padrão.

Fonte: Tabela elaborada pelos próprios autores, 2019.

Figura 7 – Correlação da expressão sérica dos miRNA-195 e miRNA-21 de acordo com o tamanho do tumor.



Fonte: Próprios autores, 2019.

Expressão sérica dos miRNA-21 e miRNA-195 em pacientes com câncer de mama expostas à quimioterapia neoadjuvante

Ao se analisar o padrão de expressão dos miRNA-21 e miRNA-195, levando-se em consideração à exposição prévia, ou não, das pacientes com câncer de mama à quimioterapia neoadjuvante, não se observou nenhuma diferença significativa entre esses grupos e nem em relação aos seus controles saudáveis (Tabela 5).

Tabela 5 – Expressão dos miRNA-21 e miRNA-195 de acordo com exposição à quimioterapia neoadjuvante.

Fatores prognósticos	miRNA-21/miRNA16			P	miRNA-195/miRNA16			P
	Controles	sQTNA	QTNA		Controles	sQTNA	QTNA	
Subgrupos moleculares				0,102				0,296
Controles	1,10±0,20	-	-		2,44±0,38	-	-	
Luminal A	-	0,77±0,19	-		-	1,81±0,37	-	
Luminal B	-	1,08±0,19	0,89±0,14		-	2,4±0,34	1,71±0,22	
HER-2	-	0,86±0,23	1,82±0,41		-	1,83±0,41	1,82±0,34	
Triplo negativo	-	0,84±0,25	0,62±0,19		-	2,05±0,51	2,92±0,72	
Estadiamento TNM				0,395				0,876
Controles	1,10±0,20	-	-		2,44±0,38	-	-	
I	-	0,90±0,21	-		-	2,10±0,41	-	
II	-	0,81±0,12	0,92±0,17		-	2,07±0,26	2,31±0,34	
III	-	1,73±0,63	1,21±0,20		-	2,02±0,74	1,80±0,25	
Grau histopatológico			0,744					0,874
Controles	1,10±0,20	-	-		2,44±0,38	-	-	
1	-	0,75±0,27	-		-	1,98±0,61	-	
2	-	0,83±0,14	1,05±0,22		-	2,19±0,32	2,15±0,38	
3	-	1,14±0,23	1,02±0,19		-	2,00±0,34	1,84±0,28	
Linfonodos				0,542				0,420
Controles	1,10±0,20	-	-		2,44±0,38	-	-	
Nenhum	-	1,00±0,15	1,12±0,19		-	2,21±0,27	1,87±0,22	
Até 3	-	0,75±0,18	0,71±0,17		-	2,06±0,40	2,61±0,50	
Maior ou igual 4	-	1,02±0,37	0,73±0,32		-	1,57±0,47	1,22±0,44	

sQTNA: sem quimioterapia neoadjuvante; QTNA: quimioterapia neoadjuvante. Valores são apresentado como média±erro-padrão

Fonte: Tabela elaborada pelos próprios autores. 2019.

Discussão

A amostra de casos de câncer de mama incluída neste estudo reflete, do ponto de vista clínico-epidemiológico, a distribuição dessa doença na população brasileira. A média de idade superior aos 50 anos e a tendência a estágios mais avançados da doença

ao diagnóstico inicial são semelhantes às descritas por Dos-Santos-Silva et al (2019) para mulheres brasileiras usuárias do SUS.

Trata-se, portanto, de mulheres com maior volume tumoral em que 50,9% delas foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante. A ocorrência de resposta patológica completa nestas pacientes foi de 17,2%, muito semelhante aos 19% relatados, em metanálise, para o câncer de mama como um todo e sem diferenciar por subgrupo molecular (HOUSSAMI et al., 2012).

No que tange às características patológicas, a distribuição entre carcinomas invasivos do tipo não especial, carcinoma lobular infiltrante e histologias mais raras, como o carcinoma papilar, ocorreu em alinhamento com aquela descrita para a população geral. Contudo, ao se analisar a disposição percentual dos subgrupos moleculares entre as pacientes incluídas neste estudo, observou-se a ocorrência do subtipo luminal B em 50,9% dos casos, percentual muito diferente dos 15 a 20% descritos na literatura para esta população (KATZ et al., 2017).

Pretendia-se com este estudo a elaboração de um painel composto de três miRNAs que fosse capaz de representar uma ferramenta diagnóstica e também prognóstica para o câncer de mama. Optou-se pela seleção do miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p por já terem sido descritos, separadamente, como biomarcadores diagnósticos e prognósticos para o câncer de mama dotados de boas sensibilidade e especificidade, respectivamente (GRIMALDI; INCONORATO, 2019).

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma desregulação no nível de expressão tecidual dos miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p. No que tange ao miRNA-21-5p, verificou-se superexpressão dessa molécula no tecido tumoral de mulheres com diagnóstico de câncer de mama, independentemente de sua exposição à quimioterapia neoadjuvante. Este achado é muito consistente com relatos anteriores que apontam essa molécula como uma das mais superexpressadas entre mulheres com diagnóstico de câncer de mama (CHEN; WANG, 2014; IORIO et al., 2005; SI et al., 2007).

Quanto ao miRNA-195-5p, molécula relatada como um miRNA supressor tumoral, observou-se uma supressão dos níveis teciduais dessa molécula entre as pacientes com câncer de mama em relação aos seus controles saudáveis, independentemente de terem ou não sido expostas à quimioterapia neoadjuvante. Esse achado reforça descrições anteriores de outros estudos que apontaram níveis suprimidos dessa molécula no tecido neoplásico mamário (CECENE et al., 2016; QATTAN et al., 2017; THAKUR et al., 2016).

É importante destacar que entre as pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante e obtiveram resposta objetiva a esse tratamento, observou-se uma diferença significativa no nível de expressão do miRNA-195-5p e também do miRNA-21-5p, quando da comparação dos grupos a partir da média dos valores absolutos dos Cq, em relação àquelas pacientes que não receberam essa intervenção, o que aponta para uma possível restauração dos níveis da expressão tecidual desses miRNAs em resposta à quimioterapia. Esses achados precisam ser melhor explorados em futuros ensaios, já que Al-Khanbashi et al. (2016) não observaram diferença no nível de expressão tecidual do miRNA-21 entre nove pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante.

Ademais, entre as pacientes que obtiveram RPC, não se observou diferença no nível da expressão tecidual do miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p quando comparada ao grupo controle. Estudos anteriores já descreveram a relação de modificações no nível de expressão de certos miRNAs (miRNA-18a, miRNA-7 e miRNA-34) em tecido tumoral residual pós-tratamento neoadjuvante com predição de sobrevida e de resposta ao tratamento (GARCÍA-VAZQUEZ et al., 2017; LUENGO-GIL et al., 2019; RAYCHAUDHURI et al., 2017; ZHENG et al., 2015). Contudo, esse achado pode refletir, tão somente, o pequeno número de pacientes incluídas neste grupo e necessita ser melhor explorado em novos ensaios.

O nível de expressão do miRNA-21-5p se manteve superexpresso para todos os subgrupos moleculares sem, contudo, alcançar significância estatística para o grupo de pacientes com tumores triplo-negativos. É possível que esse achado reflita o número limitado de pacientes analisadas nesse subgrupo já que Dong et al. (2014) descreveram superexpressão do miRNA-21 em 72 espécimes de tumores triplo-negativos. Ademais, Savad et al. (2012) relataram que a expressão dessa molécula parece não discriminar os diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama.

No que tange à expressão tecidual do miRNA-195-5p entre os diferentes subgrupos moleculares, observou-se supressão dos níveis dessa molécula entre todos os subgrupos sem, contudo, alcançar significância estatística para o subtipo HER-2-positivo. Pode justificar este fato pelos mesmos motivos apontados para o miRNA-21-5p, já que existe relato de supressão do miRNA-195 entre paciente com tumores HER-2-positivos (REZAEI et al., 2019).

Quando se analisou o nível de expressão tecidual dos miRNA-21-5p e miRNA-195-5p em relação aos estágios TNM para o câncer de mama, aos graus histológicos da doença e ao diferentes status de acometimento linfonodal, observou-se, em linhas gerais,

que o padrão de expressão dessas moléculas reproduziu igualmente entre as diferentes variáveis clinicopatológicas, os achados obtidos para o grupo total de pacientes com câncer de mama, mostrando-se superexpresso para o miRNA-21-5p e suprimido para o miRNA-195-5p.

Esses achados vão de encontro a relatos prévios que apontam uma relação inversa entre a expressão do miRNA-195 com estágios mais avançados da doença, grau histológico 3 e invasão linfonodal (SONG et al., 2012; NADEEM et al., 2017). O nível de expressão tecidual do miRNA-21-5p se revelou superexpresso independentemente do tamanho do tumor, do estagio TNM da doença, do grau histopatológico e do status de acometimento linfonodal axilar o que corrobora alguns relatos anteriores (HUANG et al., 2009; YAN et al., 2008).

Neste estudo, a expressão do nível sérico do miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p não se mostrou desregulada entre as mulheres com diagnóstico de câncer de mama em relação aos seus controles saudáveis. Esses resultados não reproduziram os achados de diversos outros estudos que foram capazes de detectar níveis desregulados desses miRNAs no soro de pacientes com câncer de mama (CECENE et al., 2016; MARQUES et al., 2018; SI et al., 2013; WANG et al., 2010; YU et al., 2018;).

Esses resultados podem ser justificados por características relacionadas aos aspectos técnicos inerentes aos experimentos como: o fluido biológico selecionado, as variações diurnas na expressão dos miRNAs, o método de coleta das amostras, contaminação, o método de extração do RNA, a ocorrência de hemólise, o método de normalização e de detecção dessas moléculas (GRIMALDI; INCONORATO, 2019).

Um dos maiores obstáculos quando se analisa a expressão de miRNAs em várias doenças diz respeito à sua normalização e, conseqüentemente, à seleção mais apropriada dos controles endógenos ou genes de referência.

Neste estudo, o RNU6B não demonstrou bons resultados como normalizador para as amostras de soro referentes aos casos e aos controles. Houve grande variabilidade nos *Cycle quantification* (Cq) dentro do mesmo grupo e, por vezes, esta molécula não foi sequer detectada. Xiang et al (2014) descreveu que para normalização de miRNAs no soro de diversos tipos de câncer, o RNU6B não demonstrou uma boa performance frente a outras moléculas como o miRNA-16, miRNA-24, miRNA-142-3p e miRNA-19b devido a grandes flutuações de Cq.

Conforme anteriormente mencionado, os miRNAs circulantes se fazem presentes nos fluidos corporais, mormente o sangue, em baixíssimas quantidades e, nessas

condições, a escolha de um método de normalização que utilizasse moléculas sintéticas poderia representar uma estratégia menos sujeita a variabilidade inerente aos controles endógenos. Destarte, os *spiked-in* RNAs como o cel-mir-39, o cel-mir-54 e o cel-mir-238 representam exemplos de moléculas capazes de monitorar a pureza de RNAs e, também, de atuarem como controles exógenos de melhor acurácia para situações em que haja níveis extremamente baixos de uma dada molécula que se pretende normalizar (KANG et al., 2012). Pretende-se, em futuro estudo, repetir a análise do nível de expressão sérica desses miRNAs utilizando-se controles exógenos como normalizadores.

Conclusões

Os resultados deste estudo demonstraram haver desregulação no nível de expressão tecidual do miRNA-21-5p e do miRNA-195-5p numa coorte de mulheres do Nordeste do Brasil com o diagnóstico de câncer de mama, o que reforça relatos anteriores que apontaram essas moléculas como “OncomiR” e miRNA supressor tumoral, respectivamente.

Contudo, não foi possível reproduzir os achados descritos previamente na literatura e que demonstraram níveis desregulados dos miRNA-21-5p e miRNA-195-5p circulantes no soro dessas pacientes em relação aos seus controles saudáveis. Esses resultados podem refletir características inerentes à população estudada ou, tão somente, aspectos técnicos quando da coleta das amostras e da condução dos experimentos, sobretudo a escolha do método de normalização selecionado.

Esses achados precisam ser confirmados em futuros estudos mediante a utilização de um método alternativo de normalização e, preferencialmente, com maior número de pacientes analisadas.

Referências

AL-KHANBASHI, Manal et al. Tissue and serum mirna profile in locally advanced breast cancer (Iabc) in response to neo-adjuvant chemotherapy (nac) treatment. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152032, 2016.

CALIN, George A.; CROCE, Carlo M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 11, p. 857, 2006.

CECENE, G. et al. Circulating miR-195 as a therapeutic biomarker in Turkish breast cancer patients. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 9, p. 4241-4246, 2016.

CHAN, Maurice et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 16, p. 4477-4487, 2013.

CHEN, J.; WANG, X. MicroRNA-21 in breast cancer: diagnostic and prognostic potential. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, n. 3, p. 225-233, 2014.

CORTEZ, Maria Angelica et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 8, n. 8, p. 467, 2011.

DONG, Guizhi et al. High expression of miR-21 in triple-negative breast cancers was correlated with a poor prognosis and promoted tumor cell in vitro proliferation. **Medical oncology**, v. 31, n. 7, p. 57, 2014.

DOS-SANTOS-SILVA, Isabel et al. Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001–14: a case only analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 6, p. e784-e797, 2019.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

GANTIER, Michael P. et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 13, p. 5692-5703, 2011.

GARCÍA-VAZQUEZ, Raúl et al. A microRNA signature associated with pathological complete response to novel neoadjuvant therapy regimen in triple-negative breast cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, p. 1010428317702899, 2017.

GIULIANO, Armando E.; EDGE, Stephen B.; HORTOBAGYI, Gabriel N. of the AJCC cancer staging manual: breast cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 25, n. 7, p. 1783-1785, 2018.

GOLDHIRSCH, Aron et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.

GRIMALDI, Anna Maria; INCORONATO, Mariarosaria. Clinical Translatability of “Identified” Circulating miRNAs for Diagnosing Breast Cancer: Overview and Update. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 901, 2019.

HAMAM, Rimi et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. **Cell death & disease**, v. 8, n. 9, p. e3045, 2017.

HENEGHAN, Helen M. et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. **Annals of surgery**, v. 251, n. 3, p. 499-505, 2010.

HOUSSAMI, Nehmat et al. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. **European journal of cancer**, v. 48, n. 18, p. 3342-3354, 2012.

HUANG, Guan-Li et al. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. **Oncology reports**, v. 21, n. 3, p. 673-679, 2009.

IORIO, Marilena V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7065-7070, 2005.

KANG, Kang et al. Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 4, 2012.

KATZ, Artur et al. Câncer de Mama. In: KATZ, Artur et al. **Oncologia Clínica Terapia Baseada em Evidências – Tumores Sólidos**. 3. ed. São Paulo: Hospital Sírio Libanês, 2017. p. 197-226.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUENGO-GIL, Ginés et al. Clinical and biological impact of miR-18a expression in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Cellular Oncology**, p. 1-18, 2019.

MARQUES, Marcia M. et al. Expression of tumor suppressors miR-195 and let-7a as potential biomarkers of invasive breast cancer. **Clinics**, v. 73, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2017.

MISHRA, Sanjay et al. Circulating miRNAs revealed as surrogate molecular signatures for the early detection of breast cancer. **Cancer letters**, v. 369, n. 1, p. 67-75, 2015.

NADEEM, Farkhunda et al. Clinicopathological features associated to MiRNA-195 expression in patients with breast cancer: Evidence of a potential biomarker. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 33, n. 5, p. 1242, 2017.

NASSAR, Farah J.; NASR, Rihab; TALHOUK, Rabih. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 172, p. 34-49, 2017.

QATTAN, Amal et al. Robust expression of tumor suppressor miRNA's let-7 and miR-195 detected in plasma of Saudi female breast cancer patients. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 799, 2017.

RAYCHAUDHURI, Mithu et al. MicroRNAs miR-7 and miR-340 predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 162, n. 3, p. 511-521, 2017.

REZAEI, Zohreh et al. Involvement of the dysregulation of Mir-23b-3p, Mir-195-5p, Mir-656-5p, and Mir-340-5p in trastuzumab resistance of HER2-positive breast cancer

cells and system biology approach to predict their targets involved in resistance. **DNA and cell biology**, v. 38, n. 2, p. 184-192, 2019.

SAVAD¹, Shahram et al. Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in breast cancer in Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 873-877, 2012.

SHAH, Parag P.; HUTCHINSON, Lauren E.; KAKAR, Sham S. Emerging role of microRNAs in diagnosis and treatment of various diseases including ovarian cancer. **Journal of ovarian research**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.

SI, Haiyan et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 139, n. 2, p. 223-229, 2013.

SI, M. L. et al. miR-21-mediated tumor growth. **Oncogene**, v. 26, n. 19, p. 2799, 2007.

SONG, C. G. et al. Correlation of miR-195 with invasiveness and prognosis of breast cancer. **Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]**, v. 50, n. 4, p. 353-356, 2012.

THAKUR, Seema et al. Identification of specific miRNA signature in paired sera and tissue samples of Indian women with triple negative breast cancer. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0158946, 2016.

VICHNOI, Anchal; RANI, Sweta. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. *In*: RANI, Sweta. **MicroRNA profiling methods and protocols**. New York: Humana Press, 2017. p. 1-7.

WANG, Fengjun et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 3, p. 586-593, 2010.

WU, Kailiu; LI, Liwen; LI, Siyi. Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas: an updated meta-analysis based on 36 studies. **Tumor Biology**, v. 36, n. 3, p. 1973-1981, 2015.

XIANG, Mengqin et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 454, n. 1, p. 210-214, 2014.

YAN, Li-Xu et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. **Rna**, v. 14, n. 11, p. 2348-2360, 2008.

YU, Xiaokang et al. Identification and Validation of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Early Detection Based on Large Scale Tissue-Derived Data. **Journal of breast cancer**, v. 21, n. 4, p. 363-370, 2018.

ZHENG, Yi et al. A microRNA expression signature in taxane-anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy response. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 7, p. 671, 2015.

4.2. ARTIGO ORIGINAL 2 - Análise da expressão do miRNA-155 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama

Artigo ainda não submetido à análise para publicação.

Autores:

Alexandre Cesar Vieira de Sales ^{1,2}

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva ¹

Matheus Carvalho Brito Leite ¹

Leandro de Lima Coutinho ¹

Renata Bezerra de Albuquerque Cavalcante Reis ¹

Danyelly Brunaska Gondin Martins ¹

José Luiz de Lima Filho ¹

Fabício de Oliveira Souto ^{1,2}

Afiliação e endereço dos autores:

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 52171-011, Recife-PE, Brasil.

² Núcleo de Ciências da Vida – NCV, Centro Acadêmico do Agreste – CAA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Marielle Franco s/n, Nova Caruaru, Caruaru, 55014-900, Caruaru-PE, Brasil.

Título

Análise da expressão do miRNA-155 no tecido tumoral e no soro de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama.

Correspondências para o autor:

Alexandre Cesar Vieira de Sales

ORCID: 0000-0002-3085-7967

e-mail: ac.sales@uol.com.br

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP 52171-011

Phone/FAX: +55 (81) 2126-8484

Resumo

Introdução: O miRNA-155 tem sido apontado como um biomarcador promissor para o diagnóstico, prognóstico e predição de resposta ao tratamento do câncer de mama. Contudo a maioria dos estudos se utilizam da análise de expressão da sequência do miRNA-155-5p e pouco se conhece acerca da expressão tecidual e sérica da sequência miRNA-155-3p. **Pacientes e métodos:** Avaliou-se, através de qRT-PCR, o nível de expressão do miRNA-155-3p em fragmento de tecido tumoral e no soro de uma coorte de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama localizado em relação a amostras biológicas correspondentes de mulheres sem o diagnóstico da doença. **Resultados:** Foram incluídas no estudo 55 pacientes com câncer de mama, das quais 28 (50,9%) foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Não se observou diferença no nível da expressão tecidual tumoral do miRNA-155-3p em relação àquela observado nos fragmentos de tecido mamário saudável. Não foi possível detectar a presença do miRNA-155-3p nas amostras de soro das pacientes com câncer de mama e de seus controles saudáveis. **Conclusão:** Neste estudo não se observou diferença significativa no nível da expressão tecidual do miRNA-155-3p entre amostras de fragmentos tumorais e de tecido mamário normal e nas amostras de soro, não houve detecção dessa molécula pelo método utilizado.

Palavras-Chave: Câncer de mama. miRNA-155-3p. Tecido tumoral. Soro. Biomarcador.

Introdução

O câncer de mama corresponde à neoplasia maligna mais comum entre as mulheres em todo o mundo com cerca de 2,1 milhões de novos casos diagnosticados da doença no ano de 2018 e representa a principal causa de mortalidade por câncer em mais de 100 países (BRAY et al., 2018). Sabe-se que quanto mais precocemente o diagnóstico é dado, maiores serão as chances de cura para esta doença. A mamografia ainda é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico precoce do câncer de mama e estima-se que sua implementação como método de rastreio para essa doença implique em uma redução de mortalidade da ordem de 20% (NELSON et al., 2012).

No Brasil, observa-se que cerca de 40% das mulheres ainda são diagnosticadas com tumores avançados mesmo após a implementação do programa de rastreamento do câncer de mama e essa estatística pode refletir certa dificuldade de acesso a esse exame

(DOS-SANTOS-SILVA et al., 2019). Nesse contexto, inúmeras moléculas têm sido identificadas e testadas como potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos para o câncer de mama.

Os microRNAs ou miRNAs são pequenos fragmentos de cadeia única não codificadores de moléculas de RNA compostas por cerca de 19 a 23 nucleotídeos em sua extensão, que controlam a expressão gênica em diversos processos fisiológicos. Dessa forma, eles exercem um papel importante na regulação pós-transcricional da expressão gênica em uma vasta gama de sistemas biológicos. Dessa forma, essas moléculas podem assumir um importante protagonismo no controle de diversas funções celulares, incluindo-se diferenciação celular, proliferação e apoptose, podem sofrer desregulação em sua biogênese e função quando da ocorrência de diversos processos patológicos como doença de Parkinson, demência de Alzheimer, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (VISHNOI; RANI, 2017).

O miRNA-155 regula múltiplas vias de sinalização celular relacionadas ao crescimento tumoral e à apoptose. Outrossim, é descrito como um biomarcador bastante promissor para o diagnóstico de vários tipos de câncer, principalmente o câncer de mama (WANG et al., 2016). É uma molécula que tem como alvo os produtos de genes envolvidos na progressão do câncer de mama como o BRCA1, o *forkhead box O3a* e o supressor da citocina sinalizadora 1 (HAMAM et al., 2017).

A maioria dos estudos que investigaram o papel do miRNA-155 como biomarcador diagnóstico, prognóstico e/ou de predição de resposta para o câncer de mama, quer avaliando seu nível de expressão tecidual ou circulante, fazem-no a partir de sua variante miRNA-155-5p (HOU et al., 2016; WANG et al., 2014; ZENG et al., 2014). Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o nível da expressão tecidual e sérica do miRNA-155-3p em fragmentos tumorais e no soro de mulheres brasileiras com o diagnóstico de câncer de mama.

Pacientes e Métodos

Aspectos éticos

Todas as mulheres participantes deste estudo concederam autorização escrita mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a utilização de suas amostras biológicas para os objetivos descritos nesta pesquisa, que foi

submetida a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital do Câncer de Pernambuco (CAAE: 75061717.3.0000.5205). Foram seguidos os preceitos da Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde e os termos descritos na Declaração de Helsinki.

Composição da amostra

Foram incluídas 55 pacientes portadoras de câncer de mama e submetidas a tratamento cirúrgico com intuito curativo no Hospital do Câncer de Pernambuco, entre os meses de maio e julho de 2018. Ressalta-se que 28 dessas 55 mulheres foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante com protocolos de tratamento selecionados a critério do médico oncologista assistente.

Os critérios de inclusão neste estudo foram: idade maior que 18 anos, comprovação histopatológica de neoplasia maligna da mama e estadiamento Tumor-Linfonodo-Metástase (TNM) entre os estadios I a III, inferindo uma doença localizada. Os critérios de exclusão consistiam em diagnóstico prévio de neoplasia malignas, de doenças neurológicas degenerativas (demência de Alzheimer e doença de Parkinson) e de doenças autoimunes, além da presença de hemólise macroscópica no soro.

As características clinicopatológicas e sociodemográficas das pacientes incluídas no estudo foram armazenadas em banco de dados gerenciado pelo pesquisador principal. O estadiamento do câncer de mama foi realizado utilizando-se os critérios descritos na 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer* TNM (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018) e os subgrupos moleculares do câncer de mama foram definidos de acordo com as características imunoistoquímicas afetas à expressão de receptores de estrogênio, de progesterona, da oncoproteína Her-2 e do índice de proliferação celular Ki-67 (GOLDHINSCH et al., 2011). Nos casos duvidosos para a expressão imunoistoquímica do Her-2, lançou-se mão da análise da amplificação dessa molécula através da técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH).

O grupo controle foi representado por fragmentos de tecido mamário saudável de nove mulheres, sem relato de comorbidades clínicas, submetidas à cirurgia plástica para fins estéticos em hospitais privados da cidade do Recife e pelo soro de 12 mulheres saudáveis, voluntárias e colaboradoras do Hospital do Câncer de Pernambuco.

Coleta e processamento do material biológico

Uma amostra simples de 5mL de sangue das mulheres com diagnóstico de neoplasia maligna da mama e também dos indivíduos do grupo controle foi coletada em tubo de ensaio para sorologia VACUETTE® 8mL com ativador de coágulo e com gel separador 16x100 (Greiner Bio-One Pré-analítico, Americana-SP, Brasil). Após coletado, deixou-se o sangue coagular a temperatura ambiente por 30 minutos. Na sequência, o sangue foi centrifugado por 10 min, a 5000rpm em temperatura ambiente. O soro resultante foi então armazenado em freezer -80°C, em duas alíquotas de 1mL em microtubos de centrifugação do tipo Eppendorf.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, realizavam-se incisões na peça cirúrgica no intuito de identificar o tumor ou o seu leito tumoral (no caso de tumores que haviam desaparecido macroscopicamente após tratamento sistêmico neoadjuvante). Então, retirava-se um fragmento tecidual de, no mínimo, 0,5x0,5cm que era alocado em tubo plástico hidrofóbico contendo 1mL de solução para preservação de ácidos nucleicos, *RNAlater*TM (Qiagen). Esse material foi estocado em freezer -20°C por até 72h e, posteriormente, armazenado em freezer -80°C em microtubos de centrifugação do tipo Eppendorf.

Extração do RNA do soro

O RNA dos soros das mulheres incluídas no estudo foi isolado com a utilização do kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. Na sequência, os RNAs foram quantificados no espectrofotômetro *NanoDrop*® *ND-1000* (NanoDrop) e tratados com 2U de *Ambion*® DNase (Life Technologies) para um volume de 50µL, em observâncias às recomendações do fabricante.

Extração do RNA tecidual

Após descongelado, 50 a 100mg do tecido tumoral eram fragmentados com lâmina de bisturi e colocados em tubo de 15mL ao qual se acrescentou 1mL de *TRIzol*® (*Invitrogen, Life Technologies*) e, em seguida, foram homogeneizados no homogeneizador *Polytron*. Após incubação em temperatura ambiente por cinco minutos, acrescentou-se 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de *TRIzol*® utilizado e agitou-se o

tubo, vigorosamente, no vortex por 15 segundos. Após incubação à temperatura ambiente por cinco minutos, o material foi centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante incolor foi transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou 0,5mL de isopropanol. Esta solução ficou incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, foi centrifugada a 12000xg a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado de modo a se obter o *pellet* de RNA no tubo e, em seguida, acrescentou-se 1mL de etanol 75% e agitou-se a solução no vortex por 15 segundos. Esse passo foi repetido mais uma vez para garantir que o RNA estivesse livre de contaminação com os reagentes usados na extração. Após a segunda lavagem com etanol 75%, o sobrenadante foi desprezado e o tubo ficou sobre a bancada aberto por alguns minutos para a secagem do pellet. O RNA foi, então, diluído em 30uL de água tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato – Sigma) e, posteriormente, armazenado em freezer a – 80°C. A quantificação do RNA foi feita no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop).

Síntese de cDNA e expressão gênica

Após a extração do RNA, foi realizada a quantificação e avaliação da pureza utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). O RNA total foi estocado em freezer -80°C para uso posterior. A síntese de cDNA dos miRNAs foi realizada a partir de 10ng de material utilizando-se o TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) e 5X RT Primer respectivos (miR-155-3p: Assay ID_002287; miR-16: Assay ID_000391; RNU6B: Assay ID_001093) seguindo as instruções do fabricante. A reação de síntese de cDNA foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA) cujo programa de ciclagem foi 16°C por 30 minutos seguidos de 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C de *hold*.

Todas as amostras foram submetidas a análise da expressão gênica através da *quantitative Real Time PCR analysis* (qRT-PCR) com o sistema TaqMan. A reação foi realizada utilizando TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), sonda 20X e água Milli-Q para um volume final de 10ul. As condições de amplificação foram realizadas de acordo com instruções do fabricante e cuja ciclagem se processou da seguinte forma: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, para ativação enzimática, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por um minuto (anelamento e extensão). Todas as amostras foram analisadas em triplicata utilizando-se a plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems, USA). O *Cycle quantification* (C_q) utilizado

para todas as análises foi 0.5 e os níveis relativos do miRNA alvo (miR-155-3p) foram normalizados pela expressão do microRNA-16 e snRNA RNU6B para as amostras de tecido, utilizando-se o método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Processamento de dados e análise estatística

Os valores da quantificação de ciclos ou *Cycle quantification* (Cq) dos microRNAs-alvo foram subtraídos dos valores de Cq dos controles endógenos (microRNA-16 e RNU6B), dando origem ao ΔCq . Na sequência, calculou-se o $\Delta\Delta Cq$ através da subtração do valor do ΔCq de cada amostra e da diferença das médias dos Cq do controle endógeno e de cada microRNA analisado. A etapa de normalização foi realizada de acordo com o $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores expressados são representados como valor do $\Delta\Delta Cq$ em uma escala *log2*. O procedimento de análise dos dados foi realizado no ambiente R (versão 3.1.1). A análise estatística foi realizada a partir da utilização de um teste não-paramétrico de Mann Whitney U Test com um nível de significância estatística de $p \leq 0,05$.

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis numéricas foram apresentadas como média \pm desvio padrão e as variáveis categóricas, como frequências relativas. Quando se verificou significância estatística, estabelecida como valor de $p \leq 0,05$, realizou-se uma análise *post hoc* para comparações simples.

Resultados

As características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama incluídas no estudo estão descritas na Tabela 1.

A média de idade das 12 mulheres que compuseram o grupo controle do soro foi de 46.8 ± 4.3 anos. No que tange aos controles teciduais, a média de idade foi de 37.8 ± 2.4 anos. É importante destacar para fins de análise dos dados que na distribuição dos subgrupos moleculares do câncer de mama, foram consideradas como Her-2 positivas 10 pacientes com tumores luminais híbridos e duas pacientes com tumores com Her-2 amplificado.

Tabela 1 - Características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama

Variáveis	Todos (n=55)	sQTNA (n=27)	QTNA (n=28)	P
Média ± desvio-padrão				
Idade (anos)	54,2±1,9	54,3±2,8	48,1±2,1	0,001
Tamanho patológico do tumor (cm)	3,44±0,31	4,00±0,44	2,89±0,41	0,087
Tamanho clínico do tumor (cm)	4,67±0,31	3,56±0,37	5,75±0,43	<0,001
Frequência n (%)				
Tipo histológico				0,589
Carcinoma tubular	1 (3,6)	2 (3,7)	-	
CINE	50 (91)	25 (92,6)	27 (96,4)	
Carcinoma lobular infiltrante	3 (5,4)	2 (3,7)	1 (3,6)	
Subgrupos moleculares				0,216
Luminal A	7 (12,7)	6 (22,2)	1 (3,6)	
Luminal B	28 (50,9)	12 (44,5)	16 (57,1)	
HER-2	12 (21,8)	5 (18,5)	7 (25,0)	
Triplo negativo	8 (14,6)	4 (14,8)	4 (14,3)	
Estadiamento TNM				0,002
Estadio I	9 (16,4)	8 (29,6)	1 (3,6)	
Estadio II	29 (52,7)	16 (59,3)	13 (46,4)	
Estadio III	17 (30,9)	3 (11,1)	14 (50,0)	
Grau histopatológico				0,338
Grau 1	4 (8,4)	3 (11,1)	1 (4,3)	
Grau 2	22 (45,8)	14 (51,9)	9 (39,1)	
Grau 3	22 (45,8)	10 (37,0)	13 (56,5)	
Linfonodos				0,995
0	35 (63,6)	17 (63,0)	18 (64,3)	
1 a 3	14 (25,5)	7 (25,9)	7 (25,0)	
≥ 4	6 (10,9)	3 (11,1)	3 (10,7)	

CINE: carcinoma invasivo não especial; CLI: carcinoma lobular infiltrante; QTNA: quimioterapia neoadjuvante; sQTNA: sem quimioterapia neoadjuvante.

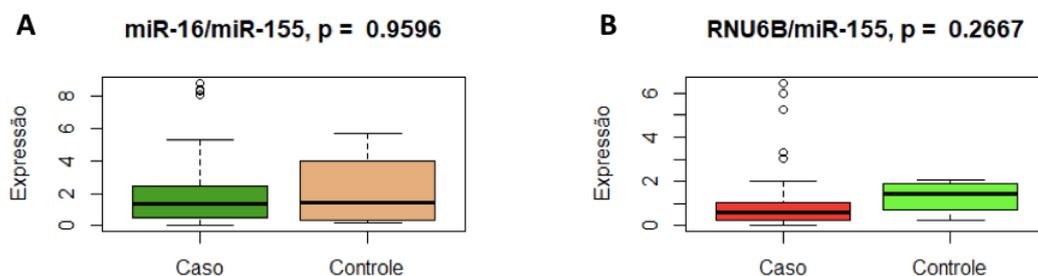
Fonte: Tabela elaborada pelos próprios autores, 2019.

A expressão tecidual do miRNA-155-3p apresentou-se com Cycle quantifications (Cq) mais tardios, com uma média de $37,68 \pm 2,25$ e, por vezes, com variabilidade de Cq superior a 0,5 ou, até mesmo, negativa dentro de uma mesma amostra, sempre analisada em triplicata.

Vale ainda ressaltar que em cinco amostras tumorais e em cinco amostras de tecidos mamários saudáveis não se detectou nenhuma expressão do miRNA-155 em todas as alíquotas analisadas, fazendo com que tivéssemos disponíveis para a análise final 50 casos e quatro controles.

A Figura 1 demonstra que quando comparada a expressão do miRNA-155 entre os tecidos tumorais e os controles saudáveis, não se verificou nenhuma diferença significativa independentemente dos genes de referência utilizados.

Figura 1 - Expressão do miR-155-3p no tecido tumoral (caso) em comparação ao grupo controle. A. Expressão de miR-155-3p utilizando-se como gene de referência o miR-16. B. Expressão de miR-155-3p utilizando-se como gene de referência o RNU6B.



Fonte: Próprios autores, 2019.

Por conta dos fatores acima mencionados, que comprometem sobremaneira a confiabilidade dos resultados obtidos, optou-se pelo não aprofundamento das análises de relação entre o miRNA-155-3p, as variáveis clinicopatológicas e, também, a exposição à quimioterapia neoadjuvante.

Houve a exclusão de cinco amostras de soro nas quais se observou hemólise macroscópica: duas amostras de pacientes com tumores Luminais A, duas amostras Luminais B e uma amostra Luminal híbrido. É importante destacar que a análise do nível de expressão dessa molécula no soro das pacientes com câncer de mama e de seus controles resultou indetectável e, portanto, não pôde ser descrita neste estudo.

Discussão

A expressão do miRNA-155-3p nos tecidos tumorais, obtida através do método de RT-PCR, revelou-se com padrão muito heterogêneo entre as amostras, ainda que analisadas sempre em triplicatas. Ademais, a análise da expressão dessa molécula no soro das pacientes com câncer de mama e de seus controles resultou indetectável. Provavelmente, este fato se deveu à utilização da sonda hsa-miR-155-3p (Assay ID: 002287, Applied Biosystems, USA) e dessa forma, optou-se por não se realizar uma análise mais aprofundada dos resultados.

A utilização do miRNA-155-3p em ensaios para validação diagnóstica em câncer de mama é pouco explorada e, recentemente, Zhang et al. (2019) relataram que esta molécula, diferente do padrão de superexpressão observado para o microRNA-155-5p, encontrava-se suprimida em 113 amostras de tecido tumoral mamário a fresco e, dessa

forma, atuara como um microRNA supressor tumoral. Esse dado específico poderia representar uma explicação racional para os resultados obtidos e anteriormente descritos.

Diante da inexistência, até o presente momento, de estudos que avaliaram, concomitantemente, a expressão tecidual e sérica do miRNA-155-3p em pacientes com diagnóstico de câncer de mama e das recentes evidências do papel dessa molécula em representar um miRNA supressor tumoral, conforme descreveram Zhang et al. (2019), poder-se-ia admitir níveis de expressão ainda mais reduzidos dessas moléculas em amostras biológicas, sobremaneira as circulantes como o soro, por exemplo. Nesse sentido, a utilização de *spiked-in* RNAs como normalizadores tem sido descrita como estratégia recomendável para melhorar a acurácia das técnicas de identificação e de quantificação de miRNAs nas situações em que são esperados níveis extremamente dessas moléculas (KANG et al., 2012).

Conclusão

Neste estudo, a expressão tecidual do miRNA-155-3p mostrou-se muito heterogênea no tecido tumoral e no tecido mamário saudável das mulheres incluídas neste estudo. Ademais, não se observou nenhuma expressão dessa molécula nas amostras de soro das pacientes e dos seus controles. Estes fatos, em muito, comprometeram a validade e a confiabilidade dos dados obtidos e, portando, necessitam ser reavaliados em futuros estudos em que se empreguem, idealmente, uma amostra maior e métodos alternativos de normalização.

Referências

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

DOS-SANTOS-SILVA, Isabel et al. Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001–14: a case only analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 6, p. e784-e797, 2019.

GIULIANO, Armando E.; EDGE, Stephen B.; HORTOBAGYI, Gabriel N. of the AJCC cancer staging manual: breast cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 25, n. 7, p. 1783-1785, 2018.

GOLDHIRSCH, Aron et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.

HAMAM, Rimi et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. **Cell death & disease**, v. 8, n. 9, p. e3045, 2017.

HOU, Yi et al. Appraising microRNA-155 as a noninvasive diagnostic biomarker for cancer detection: a meta-analysis. **Medicine**, v. 95, n. 2, 2016.

KANG, Kang et al. Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 4, 2012.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

NELSON, Heidi D. et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v. 156, n. 9, p. 635-648, 2012.

WANG, Fengjun et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 3, p. 586-593, 2010.

WANG, Faliang et al. Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: a meta-analysis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6282-6293, 2014.

ZENG, Hui et al. The clinicopathological significance of microRNA-155 in breast cancer: a meta-analysis. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

ZHANG, Lingyu et al. MiR-155-3p acts as a tumor suppressor and reverses paclitaxel resistance via negative regulation of MYD88 in human breast cancer. **Gene**, v. 700, p. 85-95, 2019.

5 CONCLUSÕES

Os miRNAs, sobretudo os circulantes, correspondem a uma classe promissora de moléculas com potencial para composição de ferramentas diagnósticas e prognósticas menos invasivas para uma grande variedade de doenças, sobremaneira o câncer.

Nesse contexto, a presente tese se propôs a avaliar a expressão de três miRNAs (miRNA-21, miRNA-155 e microRNA-195) no tecido tumoral e no soro de pacientes com diagnóstico de câncer de mama. A expressão do microRNA-21 e do microRNA-195 se mostrou desregulada no tecido tumoral dos pacientes com câncer de mama, independente da exposição à quimioterapia neoadjuvante. No caso do miRNA-21, este se apresentou superexpresso e, dessa forma, em consonância com descrições prévias que o apontaram como um miRNA que promove o desenvolvimento tumoral ou “oncomir”. Padrão oposto se observou quanto à expressão do miRNA-195, que se mostrou suprimida no tecido tumoral e concordante com a maioria dos relatos disponíveis na literatura até então.

Ainda no que tange à expressão tecidual dos miRNA-21 e miRNA-195, os resultados obtidos apontaram para uma possível restauração do nível da expressão dessas moléculas em reposta à quimioterapia neoadjuvante e esse achado precisa ser confirmado em futuros ensaios.

Entretanto, observou-se que os resultados da detecção e da quantificação sérica dos miRNAs avaliados nesta tese não foram facilmente reproduzidos. O nível da expressão sérica desses miRNAs não se mostrou alterado nas pacientes com câncer de mama em relação aos seus controles saudáveis. Esse fato pode ser atribuído ao método de normalização utilizado, às características genéticas da população e ao tamanho da amostra.

Não se detectou a expressão do miRNA-155-3p nas amostras de soro das pacientes com câncer de mama e dos seus controles. A utilização do miRNA-155-3p, em detrimento do miRNA-155-5p, pode justificar esse achado que necessita ser melhor explorado, posteriormente.

Assim, compreende-se a dificuldade de aplicabilidade na prática clínica dos achados reportados nas ciências básicas quanto ao papel dos miRNAs como biomarcadores para o câncer de mama. Destarte, faz-se mister a proposição de novos ensaios capazes de testar alternativas capazes de driblar essas dificuldades e de conferir aos miRNAs um maior protagonismo no manejo do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ABOLGHASEMI, Maryam et al. MicroRNAs in breast cancer: Roles, functions, and mechanism of actions. **Journal of cellular physiology**, 2019.
- AZEVEDO E SILVA, Gulnar et al. Acesso à detecção precoce do câncer de mama no Sistema Único de Saúde: uma análise a partir dos dados do Sistema de Informações em Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1537-1550, 2014.
- BALARO, Marcela; GOMES, Clara; KESTELMAN, Fabíola. Punção aspirativa por agulha fina, core biópsia e mamotomia guiados por ultrassonografia e mamografia. In: FIGUEIREDO, Euridice; CORREIA, Mauro; OLIVEIRA, Alexandre. **Tratado de Oncologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2013. p. 1105-1106.
- BERRUTI, Alfredo et al. Pathologic complete response as a potential surrogate for the clinical outcome in patients with breast cancer after neoadjuvant therapy: a meta-regression of 29 randomized prospective studies. **Journal of clinical oncology**, v. 32, n. 34, p. 3883-3891, 2014.
- BERTOLI, Gloria; CAVA, Claudia; CASTIGLIONI, Isabella. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122, 2015.
- BRIERLEY, James D.; GOSPODAROWICZ, Mary K.; WITTEKIND, Christian (Ed.). **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2016.
- CALIN, George Adrian et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.
- CALIN, George A.; CROCE, Carlo M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 11, p. 857, 2006.
- CECENE, G. et al. Circulating miR-195 as a therapeutic biomarker in Turkish breast cancer patients. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 9, p. 4241-4246, 2016.
- CHAKRABORTY, Chiranjib; DAS, Srijit. Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. **Tumor Biology**, v. 37, n. 5, p. 5705-5714, 2016.
- CHAN, Maurice et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 16, p. 4477-4487, 2013.
- CHEN, Xi et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. **Trends in cell biology**, v. 22, n. 3, p. 125-132, 2012.
- CORTAZAR, Patricia et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **The Lancet**, v. 384, n. 9938, p. 164-172, 2014.

CORTEZ, Maria Angelica et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 8, n. 8, p. 467, 2011.

DAI, Hongyan et al. Role of miR-139 as a surrogate marker for tumor aggression in breast cancer. **Human pathology**, v. 61, p. 68-77, 2017.

DOS-SANTOS-SILVA, Isabel et al. Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001–14: a case only analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 6, p. e784-e797, 2019.

FALATO, Claudette et al. Intrinsic subtypes and genomic signatures of primary breast cancer and prognosis after systemic relapse. **Molecular oncology**, v. 10, n. 4, p. 517-525, 2016.

FANG, Rui et al. Plasma MicroRNA Pair Panels as Novel Biomarkers for Detection of Early Stage Breast Cancer. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1879, 2018.

FAYANJU, Oluwadamilola M.; PARK, Ko Un; LUCCHI, Anthony. Molecular genomic testing for breast cancer: utility for surgeons. **Annals of surgical oncology**, v. 25, n. 2, p. 512-519, 2018.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FITZGIBBONS, Patrick L. et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.

GANTIER, Michael P. et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 13, p. 5692-5703, 2011.

GEBRIM, Luiz Henrique; QUADROS, Luis Gerk De Azevedo. Rastreamento do câncer de mama no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, 2006.

GILAD, Shlomit et al. Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay. **The Journal of molecular diagnostics**, v. 14, n. 5, p. 510-517, 2012.

GIT, Anna et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. **Rna**, v. 16, n. 5, p. 991-1006, 2010.

GOLDHIRSCH, Aron et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.

GRIMALDI, Anna Maria; INCORONATO, Mariarosaria. Clinical Translatability of “Identified” Circulating miRNAs for Diagnosing Breast Cancer: Overview and Update. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 901, 2019.

HAMAM, Rimi et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. **Cell death & disease**, v. 8, n. 9, p. e3045, 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARRIS, Lyndsay N. et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 1134, 2016.

HATAKEYAMA, Hiromitsu et al. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS one**, v. 5, n. 9, p. e12702, 2010.

HENEGHAN, Helen M. et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. **Annals of surgery**, v. 251, n. 3, p. 499-505, 2010.

HUR, Keun et al. Identification of a metastasis-specific MicroRNA signature in human colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 3, p. dju492, 2015.

IORIO, Marilena V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7065-7070, 2005.

IQBAL, Javeed et al. Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma. **Blood**, v. 125, n. 7, p. 1137-1145, 2015.

JAYANTHI, VSPK Sankara Aditya; DAS, Asim Bikas; SAXENA, Urmila. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 15-23, 2017.

KATZ, Artur et al. Câncer de Mama. *In*: KATZ, Artur et al. **Oncologia Clínica Terapia Baseada em Evidências – Tumores Sólidos**. 3. ed. São Paulo: Hospital Sírio Libanês, 2017. p. 197-226.

KENT, O. A.; MENDELL, J. T. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. **Oncogene**, v. 25, n. 46, p. 6188, 2006.

KROH, Evan M. et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). **Methods**, v. 50, n. 4, p. 298-301, 2010.

LI, Hao-Yi et al. miR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 133, 2017.

LI, Minghui et al. Circulating microRNAs from the miR-106a-363 cluster on chromosome X as novel diagnostic biomarkers for breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 170, n. 2, p. 257-270, 2018.

LI, Xin-Xin et al. Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients. **Oncology letters**, v. 9, n. 3, p. 1207-1212, 2015.

LIMA, Zeinab Safarpour et al. Application of Imaging Technologies in Breast Cancer Detection: A Review Article. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 838, 2019.

LING, Hui et al. The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis. **Gut**, v. 65, n. 6, p. 977-989, 2016.

LIU, Jingjing et al. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 46, 2013.

LOWERY, Aoife J. et al. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 360-365, 2008.

LU, Jun et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **nature**, v. 435, n. 7043, p. 834, 2005.

MARKOU, Athina et al. Direct comparison of metastasis-related miRNAs expression levels in circulating tumor cells, corresponding plasma, and primary tumors of breast cancer patients. **Clinical chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1002-1011, 2016.

MASUDA, Norikazu et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 22, p. 2147-2159, 2017.

MATAMALA, Nerea et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. **Clinical chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1098-1106, 2015.

MCDERMOTT, Ailbhe M. et al. Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87032, 2014.

MEIRI, Eti et al. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. **The oncologist**, v. 17, n. 6, p. 801-812, 2012.

MESTDAGH, Pieter et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. **Nature methods**, v. 11, n. 8, p. 809, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2017.

MONTANI, Francesca et al. miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, 2015.

MOORE, Alyssa C.; WINKJER, Jonathan S.; TSENG, Tsai-Tien. Bioinformatics resources for microRNA discovery. **Biomarker insights**, v. 10, p. BMI. S29513, 2015.

NASSAR, Farah J.; NASR, Rehab; TALHOUK, Rabih. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 172, p. 34-49, 2017.

NELSON, Heidi D. et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v. 156, n. 9, p. 635-648, 2012.

NG, Enders KO et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53141, 2013.

O'SHAUGHNESSY, Joyce. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. **The oncologist**, v. 10, n. Supplement 3, p. 20-29, 2005.

PICHLER, M.; CALIN, G. A. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. **British journal of cancer**, v. 113, n. 4, p. 569, 2015.

PICHLER, Martin et al. MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. **British journal of cancer**, v. 110, n. 6, p. 1614, 2014.

PIMENTEL, Fernando et al. Technology in microRNA profiling: circulating microRNAs as noninvasive cancer biomarkers in breast cancer. **Journal of laboratory automation**, v. 20, n. 5, p. 574-588, 2015.

QATTAN, Amal et al. Robust expression of tumor suppressor miRNA's let-7 and miR-195 detected in plasma of Saudi female breast cancer patients. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 799, 2017.

REMACLE, Jose; HAMELS, Sandrine; LONGUEVILLE, Francoise. **Detection and quantification of miRNA on microarrays**. U.S. Patent Application n. 11/242,139, 11 maio 2006.

ROSENFELD, Nitzan et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 462, 2008.

ROSENSTOCK, Aron; HORTOBAGYI, Gabriel N. Early-Stage and Locally Advanced Breast Cancer. *In*: KANTARJIAN, Hagop et al. **The MD Anderson manual of medical oncology**. New York, NY, USA: McGraw-hill, 2016. p. 551-571.

SCHMID, Peter et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2108-2121, 2018.

SINN, Hans-Peter; KREIPE, Hans. A brief overview of the WHO classification of breast tumors. **Breast care**, v. 8, n. 2, p. 149-154, 2013.

SMITH, Robert A.; DUFFY, Stephen W.; TABÁR, László. Breast cancer screening: the evolving evidence. **Oncology**, v. 26, n. 5, 2012.

SOARES, Ana M. **Enquanto eu respirar**. 1.ed. Rio de Janeiro: Sextante, 2019.

SPECTOR, Yael et al. Development and validation of a microRNA-based diagnostic assay for classification of renal cell carcinomas. **Molecular oncology**, v. 7, n. 3, p. 732-738, 2013.

SVORONOS, Alexander A.; ENGELMAN, Donald M.; SLACK, Frank J. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 13, p. 3666-3670, 2016.

THAKUR, Seema et al. Identification of specific miRNA signature in paired sera and tissue samples of Indian women with triple negative breast cancer. **PLoS one**, v. 11, n. 7, p. e0158946, 2016.

VICHNOI, Anchal; RANI, Sweta. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. *In*: RANI, Sweta. **MicroRNA profiling methods and protocols**. New York: Humana Press, 2017. p. 1-7.

VON MINCKWITZ, Gunter et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 7, p. 617-628, 2019.

WANG, Fengjun et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 3, p. 586-593, 2010.

WANG, Yahong et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. **Breast cancer research and treatment**, v. 130, n. 2, p. 489, 2011.

WANG, Ping-Yu et al. Higher expression of circulating miR-182 as a novel biomarker for breast cancer. **Oncology letters**, v. 6, n. 6, p. 1681-1686, 2013.

WANG, Faliang et al. Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: a meta-analysis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6282-6293, 2014.

WU, Qian et al. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. **Clinica chimica acta**, v. 413, n. 13-14, p. 1058-1065, 2012.

XING, Lingxiao et al. Sputum microRNA biomarkers for identifying lung cancer in indeterminate solitary pulmonary nodules. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 2, p. 484-489, 2015.

YANG, Bing et al. MicroRNA-21 in peripheral blood mononuclear cells as a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 17, n. 2, p. 223-230, 2016.

YU, Xiaokang et al. Identification and Validation of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Early Detection Based on Large Scale Tissue-Derived Data. **Journal of breast cancer**, v. 21, n. 4, p. 363-370, 2018.

ZHANG, W. et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. **Annals of oncology**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2010.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO miRNA ATRAVÉS DE BIOSSENSOR EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA AUXÍLIO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIA MALIGNA DE MAMA

Pesquisador: ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 75061717.3.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.721.630

Apresentação do Projeto:

Nas últimas décadas, tem havido um grande avanço na compreensão dos mecanismos moleculares que regem a origem, a progressão e o padrão de disseminação do câncer de mama e que têm repercussões diretas na identificação de novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas. Nesse contexto, tem-se observado a emergência de novos biomarcadores, substâncias que podem ser medidas experimentalmente e que indicam o funcionamento normal, patológico ou a resposta frente a agentes farmacológicos em um dado organismo. A identificação de mutações dos genes BRCA-1 e BRCA-2, a superexpressão da oncoproteína HER-2 por imunohistoquímica (IHQ) ou hibridização "in situ" por fluorescência (FISH) e o surgimento de painéis de risco genéticos para o câncer de mama representam exemplos de biomarcadores que têm se traduzido na escolha de tratamentos mais personalizados. Contudo, as estratégias para o rastreamento e o diagnóstico do câncer de mama sofreram poucas alterações ao longo do tempo.

Atualmente, a mamografia permanece como exame padrão ouro para o rastreio de câncer de mama entre mulheres a

partir dos 40 anos de idade e naquelas com risco aumentado para câncer de mama hereditário. Outros métodos diagnósticos como a ecografia e a ressonância nuclear magnética das mamas são considerados complementares à mamografia e têm, em geral elevado custo. Para o diagnóstico

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.721.630

dessa neoplasia, a biópsia tecidual acrescida do exame anatomopatológico e IHQ constituem as técnicas mais utilizadas. Destarte, é necessário o desenvolvimento de pesquisas capazes de desenvolver e de testar novos métodos com potencialidade diagnóstica para o câncer de mama que agreguem características de factibilidade, sensibilidade, especificidade e de baixo custo. O Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA tem investido no desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico do câncer e de inúmeras outras patologias. Recentemente, fora testado um biossensor à base de grafeno e polipirrol para detectar o miRNA-155, molécula associada ao diagnóstico e ao prognóstico do câncer de mama e de alguns outros tumores, com resultados bem satisfatórios. O propósito do presente projeto de pesquisa é avaliar a detecção do miRNA-155 presente no soro de pacientes com câncer de mama localizado através de um biossensor à base de grafeno e polipirrol, após o isolamento dessa mesma molécula pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Detectar e quantificar o miRNA-155 através de biossensor eletroquímico baseado em grafeno e polipirrol no soro e em fragmento tumoral de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama, após prévia quantificação dessa molécula através de RT-PCR.

Objetivo Secundário:

- Descrever as características da amostra quanto à idade ao diagnóstico, estadiamento tumoral, tipo e grau histopatológicos, expressão de receptores de estrógeno, de progesterona, da oncoproteína HER-2 e do Ki-67.
- Detectar e quantificar o miRNA-155 através de RT-PCR em fragmento tumoral e no soro de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama localizada antes e entre os dias 15 e 30 após o tratamento cirúrgico para a doença.
- Detectar e quantificar o miRNA-155 através de biossensor eletroquímico baseado em grafeno e polipirrol em fragmento tumoral e no soro de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama localizada, quando houver superexpressão pela técnica de RT-PCR, antes e entre os dias 15 e 30 após o tratamento cirúrgico para a doença.
- Comparar a detecção do miRNA-155 pelos métodos de biossensor baseado em grafeno e polipirrol e de RT-PCR em amostras de material biológico (fragmento tumoral e soro) de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama localizada.
- Explorar a relação entre a expressão do miRNA-155 quantificada pelos métodos de RT-PCR e de biossensor com os subgrupos fenotípicos do câncer de mama.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597	CEP: 50.040-000
Bairro: Santo Amaro	
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8005	Fax: (81)3217-8005
	E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.721.630

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos dessa pesquisa às pacientes que se propuserem, voluntariamente, a participar do estudo serão pequenos e relacionados à coleta do sangue periférico e que incluem dor e formação de equimose no local da punção, além de necessidade de mais de uma picada no caso de difícil acesso venoso periférico. Para minimizar esses riscos, serão alocados

profissionais experientes em coleta de sangue periférico. No que tange à retirada do fragmento tumoral, ele ocorrerá no próprio ato operatório previamente indicado pelo médico da paciente e, dessa forma, os riscos serão inerentes ao procedimento executado e não à coleta do fragmento tumoral para a pesquisa. Outrossim, a participação voluntária das pacientes nessa pesquisa não alterará o planejamento terapêutico definido pelos médicos assistentes do Hospital do Câncer de Pernambuco. Está assegurado à paciente voluntária em participar dessa pesquisa, a sua retirada da mesma a qualquer momento, bem como o sigilo dos dados coletados e o acesso aos resultados consolidados ao final do estudo que será anexado ao seu prontuário.

Benefícios:

Esse projeto pretende expandir a utilização de biomarcadores específicos para o câncer de mama, neste caso o miRNA-155, para fins diagnósticos e também prognósticos através da utilização de métodos de baixo custo como plataformas biossensoras, por exemplo. Ademais, pretende-se expandir as possibilidades diagnósticas para o câncer de mama utilizando-se o sangue periférico, bem mais barato, facilmente coletado e menos doloroso que a mamografia. A pesquisa do miRNA em tecido tumoral visa identificar novos biomarcadores com potencial prognóstico em mulheres já diagnosticadas com câncer de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

de acordo com o pesquisador, projeto relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

apresentação de uma emenda com a inclusão de um novo assistente de pesquisa.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro **CEP:** 50.040-000
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3217-8005 **Fax:** (81)3217-8005 **E-mail:** cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.721.630

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1159577_E1.pdf	15/06/2018 08:53:22		Aceito
Outros	CARTA_CEP2.pdf	05/11/2017 12:17:23	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LIKA3.pdf	05/11/2017 12:14:40	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLE.pdf	05/11/2017 12:12:05	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES	Aceito
Cronograma	Cronograma3.pdf	05/11/2017 12:08:57	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Brochura Pesquisa	CEP_Projeto3.pdf	05/11/2017 12:08:24	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Outros	CEP_CARTA.pdf	01/10/2017 11:33:25	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LIKA2.pdf	01/10/2017 11:28:27	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES	Aceito
Cronograma	Crono2.pdf	01/10/2017 11:26:24	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Brochura Pesquisa	CEP_Projeto2.pdf	01/10/2017 11:25:24	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Outros	Questionario.pdf	01/09/2017 21:12:44	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/09/2017 21:09:50	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/09/2017 21:09:30	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_HCP.pdf	24/08/2017 21:30:34	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES	Aceito
Outros	TermoCompromissoConfidencialidade.JPG	24/08/2017 09:27:17	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Outros	TermoUsoDadosPesquisa.JPG	24/08/2017 09:25:48	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
 Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)3217-8005 Fax: (81)3217-8005 E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.721.630

Outros	TermoSAME.JPG	24/08/2017 09:24:43	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Outros	TermoPatologia.JPG	24/08/2017 09:15:19	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Outros	TermoMastologia.JPG	24/08/2017 09:14:08	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuencia.JPG	24/08/2017 09:04:35	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LIKA.pdf	24/08/2017 09:03:10	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	24/08/2017 08:45:23	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamento.pdf	24/08/2017 08:43:15	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito
Brochura Pesquisa	CEP_HCP.pdf	23/08/2017 07:51:11	ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 19 de Junho de 2018

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro **CEP:** 50.040-000
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3217-8005 **Fax:** (81)3217-8005 **E-mail:** cep@hcp.org.br