

**ANÁLISE DOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA E DE
MICRORNAS PARA IDENTIFICAR MARCADORES
ASSOCIADOS À AGRESSIVIDADE DO CARCINOMA
MAMÁRIO EM MULHERES JOVENS**

ELEN PEREIRA BASTOS

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Maria Mitzi Brentani

Co-Orientadora: Dra. Fátima Solange Pasini

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Bastos, Elen Pereira

Análise dos perfis de expressão gênica e de micrornas para identificar marcadores associados á agressividade do carcinoma mamário em mulheres jovens / Elen Pereira Bastos - São Paulo, 2015.

160p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Mitzi Brentani

Descritores: 1. CARCINOMA. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. MICRORNAS.
4. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR.

DEDICATÓRIA

Às mulheres graciosas, e guerreiras desse mundo, que por ventura estão passando ou passaram por enfermidades como o câncer de mama em idade jovem.

Bem aventurados os que ouvem a palavra de Deus e a guardam (Lucas 11.28)

E, vendo-a Jesus, chamou-a a si, e disse-lhe: Mulher, estás livre da tua enfermidade (Lucas 13.12)

AGRADECIMENTOS

Nenhum de nós é tão inteligente quanto todos nós juntos (Warren Bennis). Portanto meus sinceros agradecimentos:

A Deus, meu guardião, meu guia, meu equilíbrio e minha paz. Em Deus eu tenho força, animo, e a certeza que no final tudo dará certo.

A minha orientadora Dra. Maria Mitzi Brentani pelos ensinamentos, discussões científicas e formação profissional e pessoal. Tive um enorme prazer em participar da pesquisa da Dra. Mitzi,

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani (em memória) pela imensurável contribuição à pesquisa no Brasil, sem o professor não seria possível realizar o meu projeto,

A Dra. Fátima Solange Pasini pela co-orientação e pelas ótimas discussões especialmente nas análises *in silico*,

A Dr. Emmanuel Dias Neto e Dr. Eduardo Moraes Rego Reis por revisarem todos os relatórios e contribuir no andamento deste trabalho.

Ao grupo da FM-USP, LIM-24: Giselly, Dra. Lucia, Dra. Simone, e todas as alunas, pela amizade, pelos auxílios burocráticos e na bancada por todos esses 7 anos que abrangeram meu mestrado e doutorado,

A ex-secretária Maria Jose do LIM-24 por toda a atenção e ajuda em todas as etapas do doutorado,

A Dra. Rosimeire Roela pela colaboração direta, principalmente com a metodologia de *microarray*,

As alunas do PIBIC do A.C. Camargo Cancer Center Amanda Duran e Ana Letícia por me auxiliarem na busca de dados nos prontuários das pacientes,

Aos membros do BIOBANCO, MSc. Eloisa Helena R. Olivieri, Louise D. Mota e MSc. Ana Paula pela competência e notória dedicação pela busca de bons materiais moleculares e pela amizade,

Aos membros do laboratório de diagnóstico do A.C. Camargo Cancer Center: Fernanda, Julia e Maria Estela pelo apoio com o equipamento de microdissecção a laser,

Aos colegas do CIPE, principalmente a equipe da Dra. Dirce Carraro pelas discussões de protocolos, por compartilhar os horários das máquinas, espaço na bancada, e empréstimo de reagentes, e também por ser o primeiro laboratório que trabalhei e foi meu “berço” na pesquisa científica.

A Meire por ter me auxiliado com as extrações de proteínas para os ensaios de RPPA,

A Dra. Iara S. Rodrigues do CIPE pela parceria e sugestões produtivas para a produção deste manuscrito,

A Dra. Adriana Trape pelas discussões produtivas e colaboração direta no ensaio do *RPPA* com o MD.Anderson Cancer Center,

Ao *RPPA Core Facility* do MD.Anderson Cancer Center pela colaboração no ensaio de RPPA,

A patologista Dra. Cynthia Osório pela discussão, ensinamento e apoio com a etapa da microdissecção a laser,

Ao patologista Dr. Victor Piana de Andrade pela dedicação na escolha da diluição dos anticorpos utilizados para a marcação do TMA e discussões produtivas principalmente em relação à microdissecção a laser,

A Dra. Helena Brentani pela colaboração direta tanto nas análises de bioinformática quanto nas discussões produtivas da tese e do artigo como um todo,

Ao grupo da Psiquiatria da USP sob supervisão da Dra.Helena Brentani pela colaboração,

Aos matemáticos: Dr. Carlos Pereira e Adriano Polpo do IME-USP pela competente e dedicada parceria nas análises estatísticas,

Ao Renato Puga e Leandro Lima pela disponibilidade e auxílio nas análises de bioinformática e programação no R,

Ao Dr.Hugo Campos pela simplicidade e competência para gerenciar o Banco de Tumores do A.C.Camargo Cancer Center.

Ao Severino, Carlinhos e Suely do laboratório de patologia Investigativa, por terem se disponibilizado para realizar os cortes de parafina e construção do TMA com toda competência e rapidez,

A toda a minha família que tanto amo, principalmente aos meus pais (Elza e Dilson), irmãos (Alisson e Daniel), Maria Eugênia e Luciane, meus sobrinhos (Jaivier e Sofia) pelo amor, compreensão, motivação, conforto e apoio.

Ao meu amor Rogério, por tudo, mas principalmente pelo fato de estar ao meu lado me motivando em todos os momentos e temperamentos, além de me auxiliar na montagem de planilhas deste manuscrito. Meu verdadeiro parceiro.

A biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center,

A pós-graduação do A.C.Camargo Cancer Center,

A FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Basto EP. **Análise dos perfis de expressão gênica e de micrornas para identificar marcadores associados á agressividade do carcinoma mamário em mulheres jovens.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama (BC) em mulheres jovens tem um comportamento biológico mais agressivo e está associado a um pior prognóstico em comparação com BC ocorridos em pacientes mais velhas. Estudos publicados anteriormente sugerem que essa característica agressiva do BC em pacientes adultas jovens (AJ) parece apresentar características biológicas particulares, enquanto que outros autores consideram a representação dos subtipos agressivos. A influência de fatores genéticos pode contribuir para o mau prognóstico de BC em jovens adultas com 35 anos ou menos. No entanto, mutação nos genes *BRCA1/2* não poderia explicar a maioria dos casos de AJ. Os microRNAs (miRs) têm sido explorados nos aspectos genéticos de BC. O objetivo do nosso trabalho foi identificar a diferença nos perfis de expressão de miRs e seus alvos (mRNAs e proteínas) entre tumores esporádicos de pacientes adultas jovens com menos de 35 anos (grupo AJ) e pacientes de meia idade com 50 a 65 anos (grupo MI), não-portadores de mutação nos genes *BRCA1 / 2*. Cinquenta pacientes brasileiras com carcinoma ductal invasivo de mama foram classificados com um fenótipo luminal. Mas características agressivas foram mais evidentes em tumores AJ, tais como maior tamanho do tumor e grau histológico avançado em comparação com tumores do MI. Usando o método de qPCR identificamos 8 miRs diferencialmente expressos em tumores do AJ em relação ao MI, com mais de 90% de confiança. A super expressão de miR-9, 33b 210, e baixa expressão de miR-372 foram correlacionados com tumores com características patológicas agressivas e a baixa expressão de miR-210 106b, 518a-3p foram associados com menor tamanho do tumor e TNM menos avançado. Alguns destes miRs foram relatados como oncomiRs ou supressores de tumores. Gene-alvos candidatos foram determinados pela análise combinada entre o miRWalk e o perfil de expressão de mRNA por microarray. Identificamos 602 gene-alvos candidatos que mostram regulação direta

ou indireta por estes miRs. Adicionalmente, baseadas nos mRNA-alvos as funções biológicas enriquecidas foram relacionadas à proliferação, ciclo celular e do desenvolvimento. A combinação de oito mRNA-alvos diretamente regulados por miRs foi considerado potenciais classificadores por serem capazes de distribuir as amostras tumorais corretamente com 88% de confiança para AJ e 85% para o grupo MI. Observamos uma associação estatisticamente significativa entre os 8 mRNAs, o grau avançado e linfonodo positivo. Perfil de expressão de 24 proteína-alvos mostrou se diferencialmente expresso entre AJ e MI. A combinação da expressão das proteínas RAF1, BCL2, PARP1, YWHAZ, eIF4, STAT5, ESR1 e RPS6KA1 foi capaz de classificar as amostras corretamente para o grupo AJ e MI com a acurácia de 95% e 89%, respectivamente. Foram encontradas associações significativas entre a expressão destas 8 proteína-alvos e o fenótipo agressivo dos tumores AJ. Os 306 genes diferencialmente expressos exclusivamente no componente estromal podem diferenciar o grupo AJ do MI. As funções biológicas enriquecidas a partir dos 306 genes do componente estromal foram relacionadas ao metabolismo, proliferação e ciclo celular, o que sugere que o componente estromal de AJ pode exibir uma atividade metabólica e proliferação mais elevada do o grupo MI. Em conclusão, análise dos perfis de expressão de miRNAs, mRNAs e proteínas podem distinguir o carcinoma de mama acometido em idade precoce de tumores ocorridos em idade tardia, sugerindo que as pacientes adultas jovens apresentam determinadas características biológicas que podem estar envolvidas com a agressividade do tumor. Além disso, oito mRNA-alvos e oito proteína-alvos poderiam ser potenciais biomarcadores de prognóstico para AJ. A assinatura dos miRs e de seus alvos podem ser relevantes para abrir um importante campo de pesquisa do carcinoma de mama em pacientes com menos de 35 anos.

SUMMARY

Basto EP. [Analysis of target-genes and miRs expression profiles to identify markers associated to aggressiveness in young patients with breast carcinoma]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Breast cancer (BC) in young patients has a more aggressive biological behavior and is associated with a worse prognosis than BC arising in older patients. Previously published studies suggested that BC in young adult (YA-BC) patients appears to present distinct biological features, others considered over representation of aggressive subtypes underlined these tumor characteristics. The influence of genetic factors may contribute to the poor prognosis of BC at young adult aged 35 years or less. However, *BRCA1/2* mutations could not explain the majority of cases arising in these patients. MicroRNAs (miRs) have been implicated in genetic aspects of BC. Using miRs, mRNA and protein expression profiles the aim of our study was to identify differentially expression profiles between sporadic tumors from young patients (under 35 years) and patients aged 50 to 65 years, non-carriers of *BRCA1/2* mutations. Fifty Brazilian patients were divided into 2 groups: young adults patients with less than 35 years (YA-BC) or middle age patients with 50 to 65 years (MA-BC) with invasive ductal breast carcinoma. All tumors were classified as presenting a luminal phenotype but aggressive characteristics were more evident in YA-BC tumors such as larger tumor size and advanced histological grade which were statistically significant different ($P<0.05$) than in MA-BC tumors. Using real time qPCR we identified 8 miRs differently expressed (over expression: miR-9 18b, 33b 106a 106b 210 and miR-518a-3p; under expression: miR-372) in YA-BC than in MA-BC tumors with more than 90% of confidence. The over expression of miR-9, 33b 210, and low expression of miR-372 were correlated with tumors pathologic aggressive features and low expression of miR-210 106b, 518a-3p were associated with smaller tumor size and less advanced TNM. Some of these miRs were reported as oncomiRs. Candidate predicted targets were determined by miRWalk algorithms. Combined results from miRWalk with mRNA expression profiles by microarray,

identified 602 potential candidate genes showing direct or indirect regulation by these miRs. In addition, enriched biological functions based on direct/indirect target-genes were related to proliferation, cell cycle and development. The combination of eight mRNAs directly regulated by miRs was considered potential classifiers since samples were correctly distributed with 88% of confidence to YA-BC and 85% to MA-BC groups. Statistical analyses between clinical pathological characteristics with the expression of the 8 target-genes identified association with advanced grade of tumor and lymphonode positivity. Expression profile of 24 target-proteins showed differentially expressed between YA-BC and MA-BC. The combination of RAF1, BCL2, PARP1, YWHAZ, EIF4, STAT5, ESR1 and RPS6KA1 proteins could classify samples into the YA-BC and MA-BC with the accuracy of 95% and 89%, respectively. Significant relationships were found between the expression of these 8 target-proteins and aggressive phenotype. The 306 genes exclusively expressed in tumoral stroma could differ tumors of YA-BC from MA-BC. The enriched biological functions related to metabolism, proliferation and cell cycle were observed, suggesting that the stromal tumor of YA-BC could display a higher metabolic and proliferation activity than MA-BC. In conclusion, differential expression analyses of these miRNAs, mRNAs and proteins distinguished early onset from late onset breast cancer suggesting that the former presented particular biological characteristics that may be involved with tumor aggressiveness. MicroRNA signature may be relevant to open an important field of research of breast cancer arising in early onset patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da mama feminina normal adulta.....	2
Figura 2	Representação dos componentes epitelial e estromal.....	3
Figura 3	Representação do carcinoma de mama in situ e invasivo.....	4
Figura 4	Biogênese via canônica do miR.....	18
Figura 5	Esquema demonstrando sitio conservado do miR (região seed) e do mRNA alvo (3'UTR).....	19
Figura 6	Esquema da interação entre miR e o mRNA-alvo.....	21
Figura 7	Circuito regulatório coordenado por eventos epigenéticos e pelos miRNAs.....	22
Figura 8	Fluxograma metodológico adotado neste projeto.....	38
Figura 9	Esquema da metodologia - sistema TaqMan microRNA Array.....	42
Figura 10	Resultados da eletroforese mensurando a integridade do miR.....	64
Figura 11	Gráfico de barras representando o número de mRNA-alvos preditos de seus respectivos miRs.....	69
Figura 12	Fotos das lâminas marcadas por hematoxilina-eosina (HE).....	72
Figura 13	Fluxograma dos resultados dos mRNA-alvos diferencialmente expressos.....	74
Figura 14	Via de sinalização da MAPK enriquecida baseada nos gene-alvos diretos ou indiretos dos miRs.....	78

Figura 15	Fluxograma representando os resultados dos miRs e mRNAs.....	79
Figura 16	Análise de classificação utilizando a combinação dos 8 gene-alvos	80
Figura 17	Fluxograma representando os resultados dos miRs e proteínas.....	89
Figura 18	Análise de classificação das amostras utilizando a combinação de 8 proteínas.....	90
Figura 19	Representação das 20 proteínas interconectadas.....	91
Figura 20	Interatoma com as 3 proteínas reguladas linearmente pelo miR.....	96
Figura 21	TMA.....	104
Figura 22	Marcação de RSK1 representando fraca expressão e forte expressão de RSK1.....	105
Figura 23	Gráfico de barras representando a marcação fraca e forte da proteína RSK1 nos grupos AJ e MI.....	106
Figura 24	Gráfico de barras representando a marcação fraca e forte da proteína RSK1 nos grupos AJ e MI.....	107
Figura 25	Imagem recuperada do equipamento de LCM.....	110
Figura 26	Diagrama de Venn.....	111
Figura 27	Esquema do mecanismo biológico proposto neste trabalho relacionado á agressividade dos tumores de pacientes jovens com carcinoma de mama.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência dos dados clinicopatológicos dos tumores das pacientes dos grupos AJ e MI.....	61
Tabela 2	Probabilidade de risco das pacientes do grupo AJ apresentarem mutação nos genes.....	62
Tabela 3	MiRs diferencialmente expressos na comparação entre os tumores (AJ vs MI).....	67
Tabela 4	Associação entre os miRs e as características clínicas do tumor.....	68
Tabela 5	Qualidade e quantidade do RNA total extraído, amplificado e marcado a partir do tecido tumoral congelado.....	71
Tabela 6	Associação da expressão de genes e dados clinicopatológicos.....	82
Tabela 7	Associação da expressão de proteínas e dados clinicopatológicos....	94
Tabela 8	Qualidade e quantidade do RNA total extraído, amplificado e marcado a partir do estroma enriquecido de fibroblastos pelo LCM.	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Dados clinicopatológicos das pacientes nos grupos AJ e MI.....	55
Quadro 2	Características clínicopatológicas das amostras tumorais dos grupos AJ e MI.....	58
Quadro 3	Quantidade e qualidade do miR das amostras tumorais do grupo AJ e MI.....	65
Quadro 4	Gene-alvos relacionados às vias biológicas (Webstalt).....	75
Quadro 5	Leitura da dosagem de proteínas para o ensaio de RPPA.....	84
Quadro 6	Perfil de expressão das 33 proteínas diferencialmente expressas.....	85
Quadro 7	Funções biológicas relacionadas às 33 proteínas (Webgestalt).....	86
Quadro 8	Representação das 24 miR-proteínas diferencialmente expressas e reguladas por pelo menos 1 miR.....	88
Quadro 9	Funções biológicas relacionadas às 20 proteínas interconectadas.....	92
Quadro 10	Vias enriquecidas, dada pelo Webgestalt, a partir do interatoma envolvendo 3 miR:mRNA:proteínas.....	97
Quadro 11	Vias biológicas enriquecidas a partir dos 308 genes exclusivos do componente estromal.....	112

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AJ	Adulto jovem
AMV	Adulto mais velho
BC	Do ingles <i>Breast Cancer</i>
	Do inglês, <i>Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and</i>
BOADICEA	<i>Carrier Estimation Algorithm</i>
cDNA	DNA complementar a fita de RNA
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CGA	Campos de grande aumento
Ck	Citoqueratina
cm	Centímetro
ct	Do inglês, <i>Cycle Threshold</i>
Cy3/Cy5	Citosina marcada com fluoróforos
DCIS	Do inglês, <i>Ductal Carcinoma in situ</i>
dCTP	Nucleotídeo Citosina
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Nucleotídeos de DNA
dscDNA	DNA complementar dupla fita
DUM	Data da ultima menstruação
EC	Estadiamento Clínico
ER	receptor de estrogênio
Estadiamento I	T1N0M0
Estadiamento IIA	T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0
Estadiamento IIB	T2N1M0,T3N0M0
Estadiamento IIIA	T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0
Estadiamento IIIB	T4N0M0,T4N1M0, T4N2M0
Estadiamento IV	qualquer T, qualquer N e M1
ETOH	Etanol
GH	Grau histológico
GN	Grau nuclear

HB4a	Linhagem de células epiteliais mamárias humanas
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
HER-2	herceptin -2
IDC	Do inglês, <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>
IM	Índice mitótico
LCIS	Do inglês, <i>Lobular Carcinoma in situ</i>
LCM	Do inglês, <i>Laser Capture Microdissection</i>
LIMMA	Do inglês, <i>Linear Models for Microarray Data</i>
LND	Linfonodo
LOG	Logaritmo
M	Molar
MammU6	MammU6 and U6 snRNA
miTG	Do inglês, <i>miRNA targeted genes</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCCN	Do inglês, <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NCCN	Do inglês, <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PALM	Do inglês, Laser-MicroBeam System
Pb	par de base
PCR	Do inglês, Polymerase Chain Reaction
pFDR	Do inglês, positive False Discovery Ratio
PR	receptor de progesterone
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAa	RNA amplificado
RNAm	RNA mensageiro
RNTP	Nucleotídeos de RNA
RNU44	SNORD44 small nucleolar RNA
RNU48	SNORD48 small nucleolar RNA

Rpm	rotações por minute
RPPA	Do ingles, <i>Reverse phase protein array</i>
RT-qPCR ou	
qPCR	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase-quantitative PCR</i>
SE	Do inglês, <i>Stroma enriched</i>
SNR	signal-to-noise ratio
TNM	Estadiamento
U	Unidade
WebGestalt	Do ingles, <i>WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit</i>
Mg	Microgramas
µg/µL	microgramas por microlitro
µL	Microlitro
Mm	Micrometro
µM	Micromolar
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
µl	Microlitro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de mama.....	1
1.2	Cenário do carcinoma mamário em mulheres jovens.....	7
1.3	Aspectos moleculares do carcinoma mamário em mulheres jovens.....	12
1.4	Os microRNAs.....	15
1.4.1	Mecanismos de regulação por microRNA.....	20
1.4.2	microRNA no carcinoma de mama.....	23
1.5	Proteoma e carcinoma de mama.....	26
1.6	Microambiente tumoral e microRNA.....	28
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.1	Objetivos Específicos.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Caracterização das Amostras	34
3.1.1	Crítérios de inclusão.....	36
3.1.2	Crítério de exclusão	37
3.2	Análises de miRs.....	39
3.2.1	Extração dos miRs	39
3.2.2	Determinação dos miRs	40
3.2.3	Análise dos miRs diferencialmente expressos	42
3.3	Análise de expressão gênica - Microarray	43
3.3.1	Extração do RNA total do tumor	43
3.3.2	Extração do RNA total do estroma tumoral enriquecido com fibroblastos por microdissecção a laser (LCM).....	44
3.3.3	Amplificação e marcação do RNA mensageiro.....	45
3.3.4	Análise do perfil de expressão gênico.....	48
3.3.5	Determinação dos mRNAs diferencialmente expressos	48

3.4	Análise proteica – Método Reverse phase protein array (RPPA).....	49
3.4.1	RPPA.....	49
3.4.2	Imunohistoquímica.....	50
3.5	Análises in silico da interação entre miRs, mRNAs e proteínas.....	51
3.5.1	Predição da interação dos mRNA-alvos e miRs	51
3.5.2	Identificação de vias biológicas enriquecidas a partir dos mRNA-alvos e das proteínas.....	52
3.5.3	Interação proteína-proteína (Interatoma)	53
3.6	Análise estatística dos dados clínicos	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Caracterização das Amostras	54
4.2	Perfil de expressão dos miRs dos carcinomas de mama em adultas jovens	63
4.2.1	Qualidade e quantificação do miR.....	63
4.2.2	Expressão de miRs-qPCR	66
4.2.3	Associação da expressão de miRs e dados clinicopatológicos	67
4.2.4	Predição dos gene-alvos in silico	69
4.3	Perfil de expressão gênico dos carcinomas de mama em adultas jovens.....	70
4.3.1	Quantidade e qualidade do RNA total do tecido fresco congelado	70
4.3.2	Determinação dos mRNA-alvos	72
4.3.3	Vias biológicas do mRNA-alvo	74
4.3.4	Análise de classificação das amostras pela expressão dos mRNA-alvos	79
4.3.5	Associação da expressão de genes e dados clinicopatológicos.....	80
4.4	Perfil de expressão proteico dos carcinomas de mama em adultas jovens	83
4.4.1	Associação da expressão de proteínas e dados clinicopatológicos	93
4.5	Integração dos dados de miRs, gênicos e proteicos	95
4.6	Expressão das proteínas reguladas linearmente pela ação do miR	103
4.7	Perfil de expressão gênico do microambiente tumoral (estroma) – Microarray.....	107
4.7.1	Quantidade e qualidade do RNA total do estroma enriquecido de fibroblastos por LCM.....	107
4.7.2	Expressão dos mRNAs do estroma enriquecido de fibroblasto.....	111

5	DISCUSSÃO.....	114
6	CONCLUSÃO	132
7	COMENTÁRIOS	134
8	PERSPECTIVAS	135
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

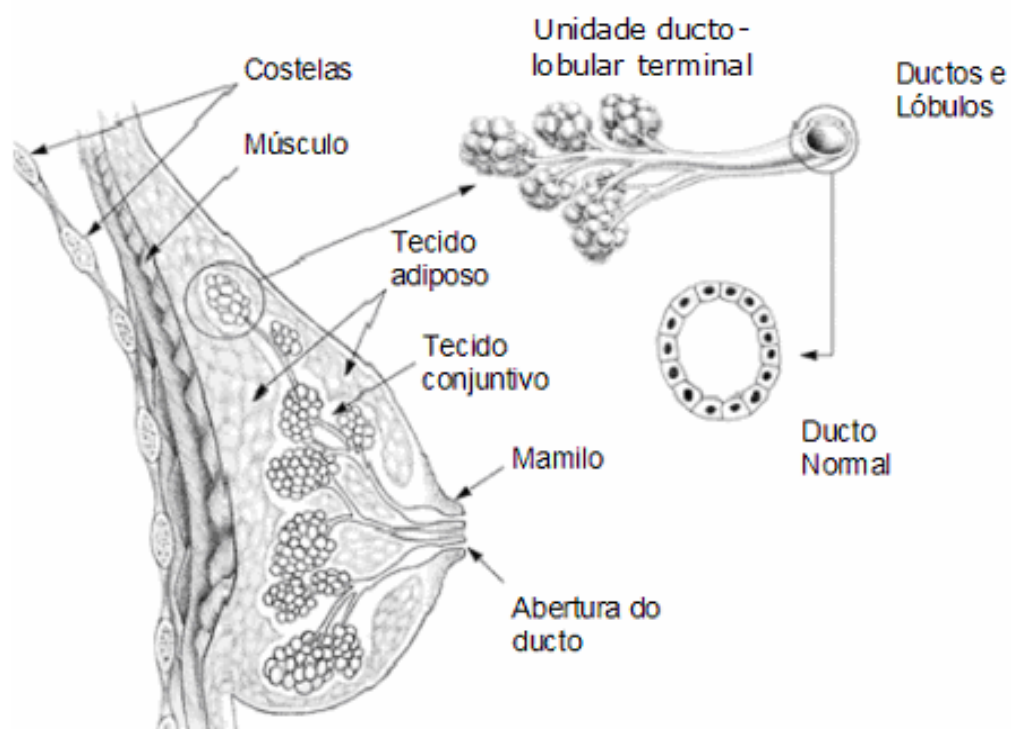
ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** 602 gene-alvos possivelmente regulados por pelo menos 1 dos
nossos 8 miRs
- Anexo 3** Associação entre dados clinicopatológicos e expressão RSK1
- Anexo 4** 129 gene-alvos exclusivos do estroma, possivelmente regulados por
pelo menos 1 dos nossos 8 miRs
- Anexo 5** Resumo do congresso Keystone Symposia
- Anexo 6** Resumo do congresso Gordon Research
- Anexo 7** Artigo 1 publicado

1 INTRODUÇÃO

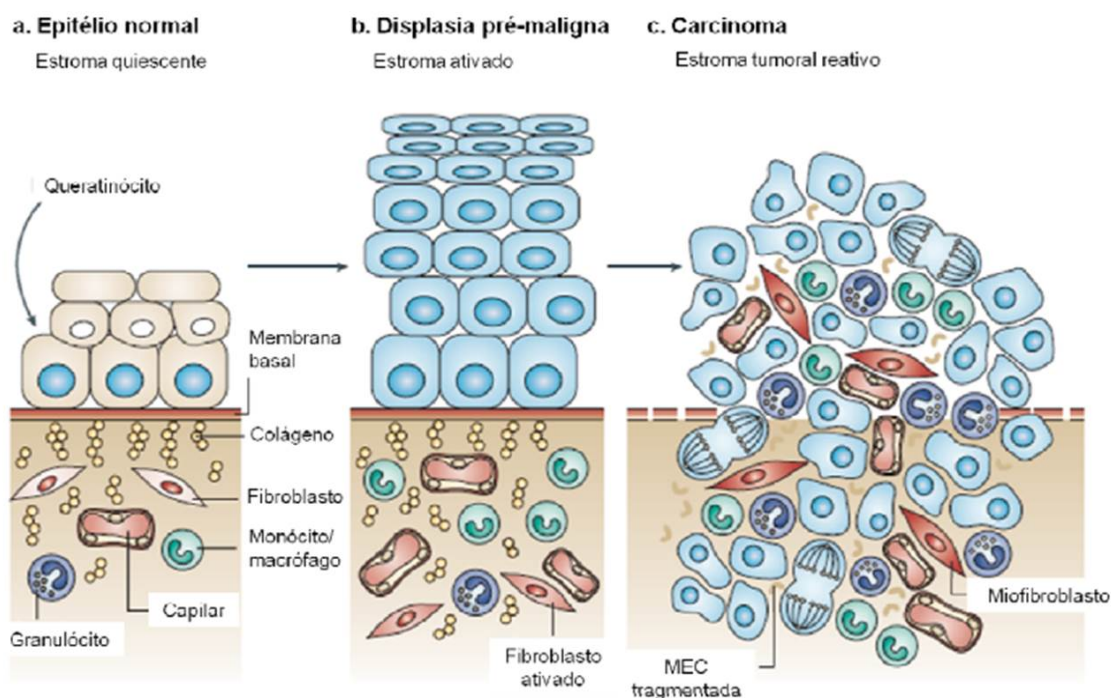
1.1 CARCINOMA DE MAMA

A mama feminina adulta exibe uma estrutura ramificada, sendo composta por elementos epiteliais e estromais. O componente epitelial é organizado em lóbulos, compostos por grupos de ácinos, que se conectam em ductos terminais e se unem formando ductos maiores, constituídos por células luminiais envoltas por uma camada de células mioepiteliais (apoio na membrana basal do ducto). Estes ductos maiores (cerca de 15-20) chegam até a papila (**Figura 1**). Já o componente estromal é representado por uma quantidade variável de tecido adiposo e conectivo fibroso, e corresponde a maior parte do volume da mama no estado não lactente (SCHNITT 1995). A matriz extracelular fornece sustentação estrutural e orienta as células epiteliais a estabelecerem uma extremidade apical e basal em uma superfície resistente e polarizada, mantendo o seu estado diferenciado. Além disso, a combinação de diversas junções aderentes regula o contato físico entre as células normais (BISSELL et al. 2002). Adicionalmente, anormalidades nessa organização, entre células epiteliais e o estroma, podem provocar o surgimento de tumores (**Figura 2**).



Fonte: The Cancer Council Victoria (2005)

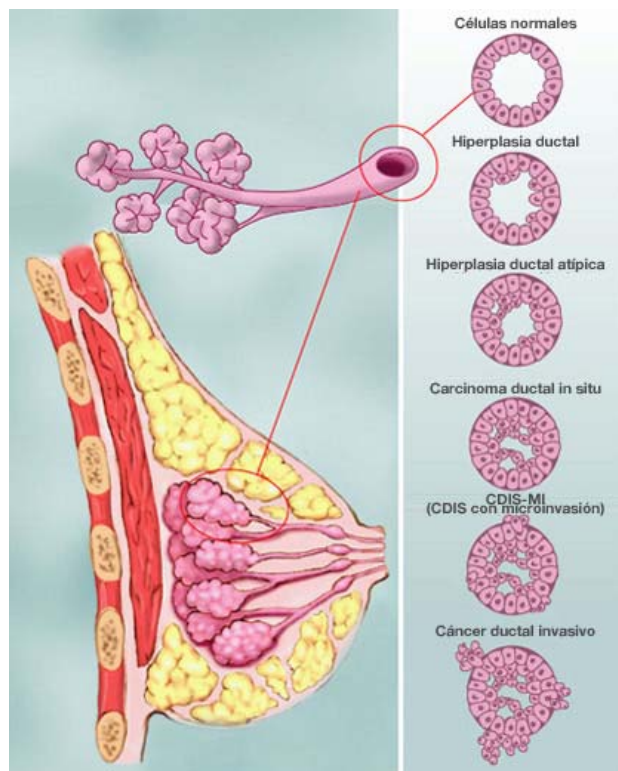
Figura 1 - Estrutura da mama feminina normal adulta. O componente epitelial possui lóbulos, grupos de ácinos, que se conectam com ductos maiores, constituídos por células luminiais envoltas por uma camada de células mioepiteliais, que por sua vez chegam até o mamilo.



Fonte: Adaptado MUELLER e FUSENIG (2004)

Figura 2 - Representação dos componentes epitelial e estromal. (A) Epitélio normal, bem diferenciado e estratificado é separado do componente estromal pela membrana basal. (B) Displasia pré-maligna, a diferenciação das células epiteliais é interrompida, a membrana basal se mantém intacta, fibroblastos tornam-se ativados, e ocorre aumento no número de macrófagos. (C) Carcinoma, é associada à proliferação das células epiteliais e à ativação do estroma tumoral. Aumenta o número de células inflamatórias e os fibroblastos apresentam-se diferenciados em miofibroblastos.

O câncer de mama pode se apresentar como carcinoma in situ e invasivo. A grande maioria dos casos de carcinoma de mama (90%) se origina de células luminais do epitélio lobular e ductal da glândula mamária. Os carcinomas ductal in situ (DCIS) e lobular in situ (LCIS) apresentam as células neoplásicas confinadas nos ductos ou lóbulos. Por outro lado, os carcinomas ductal invasivo (IDC) e lobular invasivo (ILC) se desenvolvem pela proliferação atípica de células neoplásicas que rompem a membrana basal do epitélio ductal e lobular, invadindo tecidos adjacentes e penetrando no endotélio de vasos sanguíneos e/ou linfáticos (**Figura 3**).



Fonte: Adaptado BreastCancerTreatment (2014)

Figura 3 - Representação do carcinoma de mama in situ e invasivo. Os carcinomas ductal in situ (DCIS) e lobular in situ (LCIS) apresentam as células neoplásicas confinadas nos ductos ou lóbulos. Os carcinomas ductal invasivo (IDC) e lobular invasivo (ILC) se desenvolvem pela proliferação atípica de células neoplásicas que rompem a membrana basal do epitélio ductal e lobular, invadindo tecidos adjacentes e penetrando no endotélio de vasos sanguíneos e/ou linfáticos.

De acordo com PEROU et al. (2000) o carcinoma de mama não é considerado mais uma doença única, mas uma compilação de vários subtipos distintos conforme sua expressão gênica. Desta forma, dividiu-se o carcinoma de mama em subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, HER-2, basal-like e normal-like cada subtipo apresentando implicações prognósticas e terapêuticas específicas (SORLIE et al. 2001, 2003). Os subtipos foram também definidos baseados na expressão proteica em: luminal A (ER+ e ou PR+HER-2-), luminal B (ER+ e/ou PR-HER-2+), basal-like (ER-PR-, HER-2-, citoqueratinas basais positivas e EGFR+) (CAREY et al.

2006). A classificação molecular do carcinoma de mama associa-se ao prognóstico. Assim, tumores ER+/HER-2- (luminal A) tem baixa proliferação, baixo grau histológico, poucas mitoses e baixo índice de proliferação celular. Em contrapartida tumores classificados como luminal B (ER+/PR+ HER-2+) co-expressam os genes *MKi67* (que codifica a proteína Ki67) relacionado a proliferação celular (>10% de células expressando Ki67 nuclear) e ao alto índice mitótico (HORNY et al. 1999; TAN et al. 2005). Desta forma, o subtipo luminal A responde melhor ao tratamento hormonioterápico e o luminal B melhor a quimioterapia associada à hormonioterapia (SURLIE et al. 2003; CHEANG et al. 2009).

O gene *ERBB2* (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), também, conhecido como *HER-2-neu* codifica a proteína receptora do fator de crescimento epidérmico (HER-2). A alta expressão da proteína HER-2 estimula vias de sinalização de fator de crescimento provocando proliferação celular (Di FIORE et al. 1987). A presença da amplificação (mais cópias alélicas em regiões diferentes do cromossomo) do gene *HER-2-neu*, é relevante no prognóstico das pacientes com carcinoma de mama (SESHADRI et al. 1993). ROSS et al. (2009) mostraram que este gene estava superexpresso (amplificado) em 10-34% de tumores mamários invasivos e geralmente, estão associados com alta proliferação, motilidade celular, invasão e metástases.

A composição das citoqueratinas (CKs) é produto específico do tipo de epitélio e do grau de diferenciação celular, portanto, é um importante marcador prognóstico em pacientes com tumores de mama. Cada tipo de epitélio apresenta um padrão de expressão particular de citoqueratinas. O epitélio do ducto mamário é complexo, constituído por uma camada de células mioepiteliais basais e número

variável de camadas de células epiteliais luminais. As CK 5/6, CK 14 e CK 17 são expressas nas células mioepiteliais basais, enquanto as células luminais expressam CKs próprias dos epitélios simples, tais como CK 8, CK 18, CK 19 e CK 7. Nos carcinomas de mama as CKs expressas são geralmente aquelas do epitélio luminal, mas a expressão de 5/6 e 14 CKs de padrão mioepitelial (ou basal) indicam dediferenciação basal do tumor, associando-se ao comportamento biológico mais agressivo (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001; VAN DE RIJN et al. 2002; NIELSEN et al. 2004; ABD EL-REHIM et al. 2005; FAN et al. 2006; STIEPCICH 2007).

O estadiamento do carcinoma de mama é baseado no sistema de classificação TNM, que considera a extensão do tumor primário (T), a presença e extensão de metástases em linfonodos regionais (N) e a presença de metástases á distancia (M). Esse sistema foi criado pela *UICC (Union Internationale contre le Cancer)* e pelo *The American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e se fundamenta em achados anteriores ao tratamento (cTNM), obtidos normalmente pelo exame físico e diagnóstico por imagem, e também em achados pós o tratamento cirúrgico (pTNM), observados pelo exame histopatológico do espécime cirúrgico, que avalia a combinação do grau histológico e nucelar, razão do índice mitótico e arranjo do tumor, e também avaliação dos linfonodos, para detectar a presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais, que são características mais significantes para a recorrência do tumor e menor tempo de sobrevida das pacientes (SMART et al. 1997).

O carcinoma de mama é o câncer que mais acomete em mulheres de todo o mundo. Essa neoplasia representa 21% de todos os tipos de câncer diagnosticados

nas mulheres. No Brasil, para o ano de 2014, são esperados 57.120 novos casos de câncer de mama, com o risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2014). Adicionalmente, a frequência do carcinoma de mama em mulheres com idade entre 50-64 anos foi de 38% e 4.3% em mulheres com menos de 35 anos (Fundação Oncentro de São Paulo-FOSP 2014). Evidentemente, o carcinoma de mama acometido em mulheres com idade jovem (< 35 anos) se comporta diferentemente nas mulheres com idade mais avançada (acima dos 50 anos).

1.2 CENÁRIO DO CARCINOMA MAMÁRIO EM MULHERES JOVENS

A ocorrência de carcinoma de mama em pacientes com idade abaixo de 35 anos é considerada rara mundialmente, representando cerca de 2 a 5% de todos os casos (WALKER et al. 1996; GONZALEZ-ÂNGULO et al. 2005), entretanto retrata um cenário clínico crescente. Segundo BRINTON et al. (2008), este tumor acometeu 6,4/100.000 mulheres na faixa etária de 25-29 anos no ano de 1983 e seguiu com crescente aumento nos anos seguintes, atingindo 7,8/100.000 mulheres/ano entre 1999-2000 (BRINTON et al. 2008). Segundo a *Fundação Oncocentro de São Paulo-FOSP* (2014), São Paulo apresenta cerca de 4,3% de mulheres com carcinoma de mama em idades entre 14-34 anos.

A frequência de casos de carcinoma de mama diagnosticado em mulheres jovens (< 35 anos) nos países desenvolvidos corresponde a 3-7% dos casos (TICHY et al. 2013), porém nos países em desenvolvimento essa frequência é maior,

representando 25% dos casos (EL SAGHIR et al. 2007). Os motivos do aumento da incidência do carcinoma de mama em mulheres jovens nos países em desenvolvimento são provavelmente devido ao mau uso dos esforços de triagem e devido à tendência da adoção do estilo de vida ocidental no qual se refere a um legado cultural de normas sociais bem como: profissionalismo, menor número de filhos, gestação mais tardia e obesidade (TICHY et al. 2013).

Fatores de risco para o carcinoma de mama em mulheres com idade > 50 anos parecem mais evidentes tais como: envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher (terapia hormonal, menopausa tardia, menarca precoce, nuliparidade e uso de contraceptivos), história familiar de carcinoma de mama, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, fatores ambientais (dieta, stress e exposição à radiação ionizante), e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (SALEHI e TURNER 2008). Entretanto, para o carcinoma de mama em mulheres em idade jovem permanecem desconhecidos. Contudo, menarca precoce, baixa fertilidade e aumento da expectativa de vida parecem exercer pouco impacto no grupo de pacientes jovens (FERLAY et al. 2013). Porém, dados clínicos e epidemiológicos sugerem ser um processo multifatorial, dependente da interação de fatores ambientais e étnicos (ORTEGA JACOME et al. 2010; TRICOLI et al. 2011). Estudos utilizando pacientes de origem asiática, européia e norte americana demonstraram uma maior incidência desta neoplasia em mulheres negras com idade inferior a 35 anos (16,8/100.000 mulheres ao ano). No entanto, no grupo de pacientes com idade superior a 40 anos este tumor foi mais frequente na raça branca, concluindo que o fator étnico contribui para o entendimento da incidência desta neoplasia tanto em pacientes jovens como

em pacientes mais velhas (BRINTON et al. 2008; KEEGAN et al. 2012). PENA et al. (2011) buscaram correlacionar o aparecimento desta neoplasia na população brasileira. Neste estudo, os autores avaliaram um grupo de pacientes com descendência européia (68%), ameríndia (21%) e africana (11%), oriundas de diferentes regiões geográficas do Brasil e concluíram que a população brasileira é altamente heterogênea, e é composta por ancestrais indígenas, europeus, africanos e asiáticos. Neste sentido, a miscigenação étnica da população brasileira adiciona mais complexidade na busca por fatores de risco do carcinoma de mama no Brasil, diferentemente observado nos países menos heterogêneos cujo fator étnico coopera para o entendimento da ocorrência do carcinoma de mama (PENA et al. 2011).

No Brasil, o carcinoma de mama continua sendo a causa de morte predominante em mulheres de todas as idades apresentando 12,1 mortes para cada 100 mil habitantes (Ministério da Saúde 2014) com cerca de 520 mil mortes estimadas para o ano de 2012 (Ministério da Saúde 2014). Este evento ocorre com mais frequência nas pacientes jovens (61% (41/106)) do que nas pacientes acima de 60 anos (33% (43/130)) (DUTRA et al. 2009). O carcinoma de mama em pacientes jovens geralmente apresenta um caráter mais agressivo quando comparado aos tumores desenvolvidos em pacientes pós-menopausadas (COLLEONI et al. 2002). DUTRA et al. (2009) demonstraram que estes tumores frequentemente apresentam grau histológico III, presença de linfonodos positivos, estadiamento de alto grau e pior sobrevida, características clínico-patológicas compatíveis à doença agressiva (FERNANDOPULLE et al. 2006; DUTRA et al. 2009). A presença de metástase tumoral em linfonodos axilares também é um dos fatores prognósticos mais relevantes em pacientes com tumores malignos de origem epitelial em idade jovem

(BALCH et al. 2001). O índice de acometimento de metástase a distância (sítio secundário) em pacientes jovens é mais frequente quando comparado com pacientes acima de 50 anos de idade (YANKASKAS 2006; ANDERS et al. 2008a; JOHNSON et al. 2009). Semelhantemente, nosso grupo demonstrou que em mulheres com idade inferior a 35 anos apresentavam tumores com estadiamento clínico elevado quando comparado com mulheres com idade superior a 40 anos (CARRARO et al. 2013). Adicionalmente, outros estudos indicam que a precocidade de aparecimento do tumor indica um mau prognóstico, e a adoção de terapias geralmente mais agressivas não as favorecem (XIONG et al. 2001; FERNANDOPULLE et al. 2006; BEADLE et al. 2009; ORTEGA JACOME et al. 2010).

O retrato clínico crescente em mulheres jovens por carcinoma de mama está diretamente relacionado à dificuldade em se diagnosticar a doença. O exame de mamografia não é considerado um teste preventivo de rotina para as mulheres com idade inferior a 40 anos, além disso, este exame não é eficaz nos casos que possuem tecido mamário denso comumente presentes nas mulheres jovens (HOUSSAMI et al. 2003), e portanto, o exame de ultrassonografia e ressonância magnética são indicados para as mulheres jovens, embora exista a limitação de não detectar microcalcificações por este exame. Desta forma, se faz necessário o investimento na identidade destes tumores, a fim de melhorar as abordagens de prevenção incluindo identificação de preditores de risco e novos biomarcadores.

O tratamento do carcinoma de mama em mulheres jovens é considerado mutilador e excessivo (*over-treated*). Pacientes jovens realizam mastectomia seguida de quimioterapia com maior frequência do que as pacientes mais velhas. Dentre as pacientes jovens tratadas 26% evoluíram para óbito, enquanto no grupo das pacientes

mais velhas submetidas ao mesmo tratamento 17% evoluíram com o quadro (FREDHOLM et al. 2009). Segundo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para carcinoma de mama é recomendável o tratamento adjuvante durante 5 anos com tamoxifeno em pacientes jovens com tumores positivo para o receptor de estrógeno (ER) (THERIAULT et al. 2013). Apesar de tratamentos mais agressivos nestas pacientes, o evento de óbito neste grupo ainda é frequente. Assim, equilibrar os benefícios da terapia neoadjuvante (tratamento pré-cirúrgico) com as sequelas do tratamento ao longo prazo (adjuvante) é primordial para aprimorar a sobrevida das pacientes, contudo o manejo para essas pacientes continua contraditório. A baixa eficácia do tratamento com tamoxifeno nas pacientes jovens pode ser explicada devido à baixa presença de receptor de estrógeno livre (alvo do tamoxifeno) em comparação com mulheres pós-menopausadas que apresentam mais receptor de estrógeno livre devido à baixa produção de estrógeno (característica principal do status pós-menopausal). Existe uma necessidade considerável em encontrar marcadores de diagnóstico e prognóstico para auxiliar a clínica no melhor manejo dessas pacientes. Desta forma, é evidente que o carcinoma de mama em mulheres com idade inferior a 35 anos é mais agressivo e indica um pior prognóstico em relação aos tumores desenvolvidos em mulheres com idade superior a 50 anos.

1.3 ASPECTOS MOLECULARES DO CARCINOMA MAMÁRIO EM MULHERES JOVENS

A prevalência de história familiar de carcinoma de mama em pacientes jovens é cerca de 16-37%, sugerindo uma possível susceptibilidade genética, entretanto mutações nos genes *BRCA1/BRCA2* podem explicar apenas 10% dos casos, dependendo da população estudada. Dentre os casos com história familiar a frequência de mutação nesses genes é de 10-36%, e em casos esporádicos essa frequência é ainda menor (10%) (MALONE et al. 1998; LOMAN et al. 2001; DE SANJOSÉ et al. 2003; UHRHAMMER et al. 2008). A frequência de carcinoma de mama associado à história familiar (fator de risco) e a presença de mutações nos genes *BRCA1/BRCA2* é pequena. Portanto, é notável que uma grande proporção de pacientes jovens que desenvolvem o carcinoma de mama não sejam portadoras da mutação nos genes *BRCA1/2* e não apresentem história familiar da doença. Desta forma, o conhecimento das bases genéticas destes tumores que levam a presença de características mais agressivas e sem a presença de mutação nos genes *BRCA1/BRCA2* ainda é limitado.

Geralmente, os carcinomas de mama não portadores de mutações nos genes *BRCA1/BRCA2* apresentam estes genes silenciados. De acordo com WONG et al. (2011), a perda genética de *BRCA1* foi associada com a hipermetilação desse gene em 4% das pacientes com idade inferior a 40 anos e com história familiar, sem a presença da mutação. Outro tipo de disfunção sugerida nestes casos inclui a super expressão de ID4, um regulador negativo de *BRCA1* (TURNER et al. 2007). Estas disfunções também poderiam aparecer nos casos esporádicos (NATRAJAN et al.

2010). HEDENFALK et al. (2003) publicaram o perfil molecular do carcinoma de mama familiar, não associado a mutações nos genes *BRCA1/2* em pacientes com idade entre 36-79 anos e verificaram que este grupo era bastante heterogêneo, refletindo várias subclasses, e desta forma, sugeriram um modelo poligênico para este grupo de tumores (HONRADO et al. 2005). Recentemente, em um estudo do nosso grupo demonstramos baixa frequência de mutação nos genes *BRCA1/2* nos tumores de mama em mulheres com idade inferior ou igual a 35 anos. Dentre as pacientes jovens com história familiar, 43% dos tumores apresentaram a mutação, enquanto que nos tumores esporádicos a frequência de mutação foi de 9%. Além disso, as mutações foram identificadas em tumores com receptor de estrógeno positivo (12%) e triplo negativo (45%) (CARRARO et al. 2013). No entanto, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de tumores de mama, esporádicos ou familiares, em mulheres jovens não portadoras da mutação germinativa nos genes *BRCA1/BRCA2* ainda não estão claros.

Recentemente, ANDERS et al. (2008b) sugeriram que estes tumores em idade jovem são uma entidade específica independente das síndromes hereditárias, sugerindo que as características agressivas apresentadas por estes tumores possivelmente derivam de vias oncogênicas específicas. Baseando-se nas subclassificações moleculares e na heterogeneidade do carcinoma de mama ANDERS et al. (2011) levantaram a hipótese de que as diferenças biológicas relativas à idade poderiam ser dependentes dos subtipos e que pacientes jovens poderiam estar relacionadas a subtipos mais agressivos, enquanto as mulheres pós-menopausadas (≥ 50 anos) incluíram nos subtipos com melhor prognóstico.

O conhecimento do perfil de expressão gênico em carcinoma de mama tem contribuído para o desenvolvimento de biomarcadores favorecendo o prognóstico das pacientes. A assinatura de certos genes relacionados à invasão, expressos preferencialmente em tumores de mama, parece indicar uma menor sobrevida de pacientes sem ocorrência de metástase e, assim, pode representar uma ferramenta adicional para estabelecer o diagnóstico clínico destas pacientes (LIU et al. 2007). Adicionalmente, dados públicos mostraram que a maior proporção de pacientes jovens (com idade ≤ 45) exibe tumores basal-like e HER-2 positivo, ou seja, marcadores de mau prognóstico (GABRIEL e DOMCHEK 2010). Além disso, foi observado que os tumores presentes nestas pacientes exibiam graus mais elevados, indicando pior prognóstico (ANDERS et al. 2011). Em contra partida, AZIM et al. (2012) identificou genes e vias biológicas candidatas relacionados à idade das pacientes e não ao subtipo tumoral, que possibilitou caracterizar o carcinoma de mama em idade precoce. Neste trabalho, foram encontrados 16 genes candidatos a carcinogênese da mama em pacientes com idade inferior a 40 anos. Esses genes estão associados, principalmente, à maturação de células mamárias, sinalização dos fatores de crescimento, como da via de sinalização da MAPK e phosphoinositide-3- kinase (PI3K). Além disso, foi observada a baixa expressão de genes relacionados a apoptose. Portanto, os autores demonstraram que a assinatura dos genes relacionados à proliferação parece ter relevância clínica em pacientes com idade inferior a 40 anos. Além disso, este estudo também demonstrou que as pacientes jovens com os tumores de mama ER+/HER-2- apresentam menor sobrevida livre de doença quando comparadas com o mesmo tipo de tumor em mulheres mais velhas (> 50 anos). Assim, esses resultados fortalecem a hipótese que a idade adiciona uma identidade

biológica complexa, independente das diferentes distribuições dos subtipos do carcinoma de mama nas mulheres jovens (AZIM et al. 2012).

Atualmente existem muitos desafios para o entendimento do carcinoma mamário, apesar da classificação morfológica utilizar marcadores moleculares, ainda hoje muitas pacientes com o mesmo diagnóstico e prognóstico clínico podem apresentar resultados muito diferentes, tanto em relação à progressão, recidiva e presença de metástase (NAKHLIS e MORROW 2003; SOTIRIOU et al. 2003). Assim, um refinamento adicional nas assinaturas gênicas vem sendo feito e tem revelado classificadores promissores, como os microRNAs (miRs ou miRNAs), que regulam a tradução e estabilidade dos RNAs mensageiros (mRNA) (LEE et al. 1993). Os miRs têm apresentado um perfil de expressão aberrante em muitos tipos de câncer exercendo o papel de supressor de tumor ou oncogene (oncomiR) dependendo de qual ou quais genes ou vias ele regula (IORIO et al. 2005; SILVERI et al. 2006; HOFFMAN et al. 2009), e assim, estas moléculas aparecem como possíveis alvos para diagnóstico e prognóstico de pacientes com carcinoma de mama.

1.4 OS MICRORNAS

Um aprimoramento nas assinaturas gênicas adveio da determinação de miRs, que regulam a tradução e estabilidade dos mRNA sendo responsável pela regulação de 30% dos genes codificantes de proteína. A partir de 2005, o miR ganhou sua importância principalmente na área da oncologia (IORIO et al. 2005). Atualmente sabe-se que os miRs estão desregulados em carcinomas de mama exercendo papel de oncomiR (miR inibindo o gene supressor de tumor) ou supressos de tumor (miR

inibindo oncogene) dependendo de qual ou quais genes ou vias eles regulam (SILVERI et al. 2006; HOFFMAN et al. 2009).

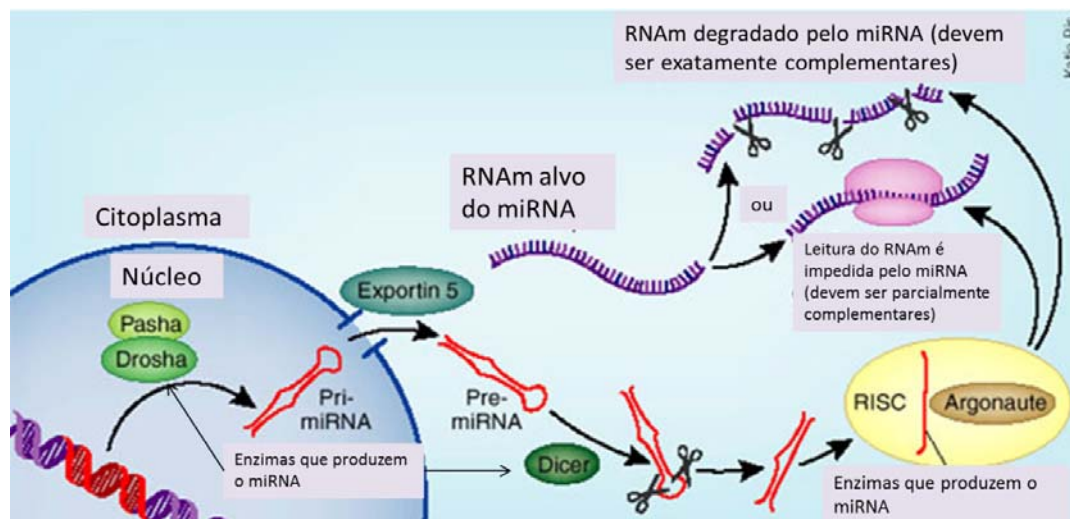
O miR se expressa de maneira tecido específico, e desta forma, regulam diversos processos biológicos, incluindo ciclo celular, proliferação, diferenciação celular, apoptose e desenvolvimento (AMBROS 2004). O efeito regulatório dos miRs pode ser investigado por análise da variação da expressão gênica dos seus alvos, por meio da análise do perfil de microarranjos (*microarray*) (JAYASWAL et al. 2011), e também por análise da expressão protéica, uma vez que agem sob a tradução dos gene-alvos (LEIVONEN et al. 2009).

A desregulação dos miRs em câncer pode ocorrer em ambos os níveis: genético, incluindo anomalias genéticas (rearranjo cromossômico, deleção, amplificação ou mutação na sequência), e epigenético (metilação e remodelamento de histonas, que incluem locos com sequência precursora do miR), ou alteração no mecanismo da biogênese do miR. Mais de 50% de sequências precursoras dos miRs estão localizados sob ou próximo do sítio frágil do cromossomo e outras regiões genômicas relacionadas ao câncer, o que provocam mudanças drásticas na expressão dos miRs (MELO e ESTELLER 2011).

Os miRs são moléculas de RNA simples de 19 a 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que atuam como potentes reguladores pós-transcricionais, embora exista relatos atípicos de que os miRs podem ter ação pré-transcricional, agindo como fatores de transcrição nuclear (HUANG et al. 2012).

A biogênese do miR pela via canônica inicia-se com a transcrição dos mesmos a partir do genoma, geralmente intrônica mas também da região exônica, pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito contendo cap 5' e cauda

poliA+, denominado miRNA primário (pri-miRNA). Este, por sua vez, é processado ainda no núcleo pela enzima RNase III DROSHA, resultando num transcrito menor em forma de grampo, o miRNA precursor (pre-miRNA), de aproximadamente 70 nucleotídeos, com extremidade 3' contendo 1 a 4 nucleotídeos extras (IORIO et al. 2005). O pré-miRNA é exportado para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/Ran-GTP, onde é clivado pela enzima DICER, gerando transcritos de fita dupla, de 19 a 25 nucleotídeos, denominados duplex de miRNAs maduros (LAU et al. 2001; RICARTE-FILHO et al. 2009). Este produto, que tem as duas extremidades 3' contendo 1-4 nucleotídeos extras, é então incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), que inclui a proteína Argonata como um de seus principais componentes. A fita que possuir a menor estabilidade no pareamento de sua extremidade 5' parece ter preferência no complexo RISC, tornando-se a fita ativa para o posterior pareamento com o RNA mensageiro alvo (mRNA-alvo) (**Figura 4**).



Fonte: Adaptado de MACK (2007)

Figura 4 - Biogênese via canônica do miR. O miR é transcrito da região genômica, geralmente não codificante, pela RNA polimerase II, gerando pri-miRNA. Este, é processado pela enzima RNase III DROSHA, resultando no pre-miRNA com extremidade 3' contendo 1 a 4 nucleotídeos extras, que é exportado para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/Ran-GTP, onde é clivado pela enzima DICER, gerando o duplex de miRNAs maduro. Este produto, que tem as duas extremidades 3' contendo 1-4 nucleotídeos extras, é então incorporado ao complexo RISC/Argonaute, formando o miR ativo que realiza o pareamento com mRNA-alvo.

O miR pode ser classificado em intragênico ou intergênico, dependendo da sua localização numa região genômica que transcreve um gene ou não (LEE et al. 2002). Atualmente, aproximadamente 2.588 miRs humanos foram descritos no *miRBase* (2014), no entanto, suas funções ainda não estão claras. Geralmente, os miRs que possuem sequências idênticas ao longo dos nucleotídeos 2-8 dos miRs maduros pertencem a mesma família de miRs. Até o momento, o genoma humano possui 14 *locis* parálogos (codificam os miR-irmãs) que pertencem a família do let-7. Trinta e quatro famílias de miRs são filogeneticamente conservados entre humanos e *C. elegans*, enquanto 196 famílias de miRs são conservados entre mamíferos. As sequências genômicas que transcrevem (ou codificam) os miRs, evolutivamente conservadas, favorecem a predição *in silico* por potenciais alvos preditivos (mRNA-alvo), como exemplificado na **Figura 5** (GAIDATZIS et al. 2007). Os miR-irmãs geralmente atua redundantemente sob o mRNA-alvo, no entanto, funções distintas são relatadas. Alguns miRs possuem origem revolucionária comum, mas diverge na região, chamado de região da semente (do inglês, *seed region*), região importante para o reconhecimento do mRNA-alvo, promovendo funções completamente diferente destes miRs (CHIANG et al. 2010).

Sequencia "seed" conservada do miR-1 e seu alvo IGF-1 3'UTR

Humano	5'-CCAAUGAAAUAACACAAGUAAACAUUCCAA-3'(165-193)
Camund.	5'-CCAAUGAAAUAUACAAGUAAACAUUCCAA-3'
Rato	5'-UCAAUGAAAUAUACAAGUAAACAUUCCAA-3'
Vaca	5'-UCCCCCAAUGAAAUAAGUAAACAUUCCAA-3'
Cervo	5'-CCCCCAGUGAAACGAGUAAACAUUCCAA-3'
miR-1	3'-UAUGUAUGAAGAAUGUAAGGU-5'

Fonte: Adaptado de HU et al. (2013)

Figura 5 - Esquema demonstrando sitio conservado do miR (região *seed*) e do mRNA alvo (3'UTR).

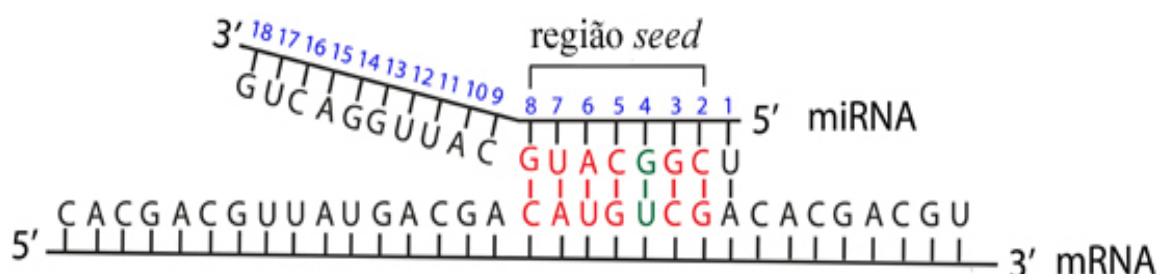
A nomenclatura do miR é dado numericamente: miR-* para microRNA maduro e mir-* para microRNA precursor. Sequências genômicas precursoras de miR-irmãs é indicada com a letra no sufixo (ex: mir-200a e mir-200b). Se o mesmo miR maduro é gerado a partir de múltiplo *loci* separado o sufixo numérico é adicionado no final (ex: mir-200b-1 e mir-200b-2). Cada locus produz dois miRs maduros: um da fita 3' (ex: miR-200-3p) e outro da fita 5' (ex: miR-200-5p) do precursor, no entanto, um braço, chamado de fita guia, é geralmente mais prevalente (96%) e mais ativo biologicamente do que o outro braço, chamado de fita passageira (ex: miR-200*) (miRBase 2014).

A transcrição do miR da via canônica é dada a partir da sequência genômica intrônica da região não codificante ou codificante do gene, mas alguns miRs são transcritos pela região exônica. Muitos *locis* dos miRs estão próximos entre si, constituindo a transcrição policistrônica, que muitas vezes, pode gerar grupos de miRs (*cluster*) co-transcritos, porém cada miR maduro atua individualmente a nível pós-transcricional (LEE et al. 2002). A localização precisa das sequências precursoras dos miRs no genoma ainda não foi propriamente mapeado, no entanto, se sabe que alguns promotores dos miRs residem nos íntrons dos genes codificadores de proteínas (miRtrons), e portanto compartilham o mesmo promotor do gene codificante, no entanto é importante mencionar que o miR tem geralmente múltiplos sítios de início de transcrição (OZSOLAK et al. 2008).

1.4.1 Mecanismos de regulação por microRNA

O mecanismo clássico de regulação do miR é a ação repressora pós-transcricional de gene-alvos podendo inibir a tradução ou mais frequentemente

degradar o mRNA (LIM et al. 2005) dependendo do pareamento parcial ou perfeito dos nucleotídeos do miR da região 5' (chamado de região da semente, do inglês, *seed region*) com a região 3'UTR do gene-alvo (miR:mRNA) (BARTEL 2009). A região *seed* localizada no domínio final da região 5' do miR, que se encontra os nucleotídeos da posição 2 a 7nt, é crucial para o reconhecimento do alvo, no entanto os demais nucleotídeos do miR (13-16nt) também contribuem para o pareamento miR:mRNA (**Figura 6**).

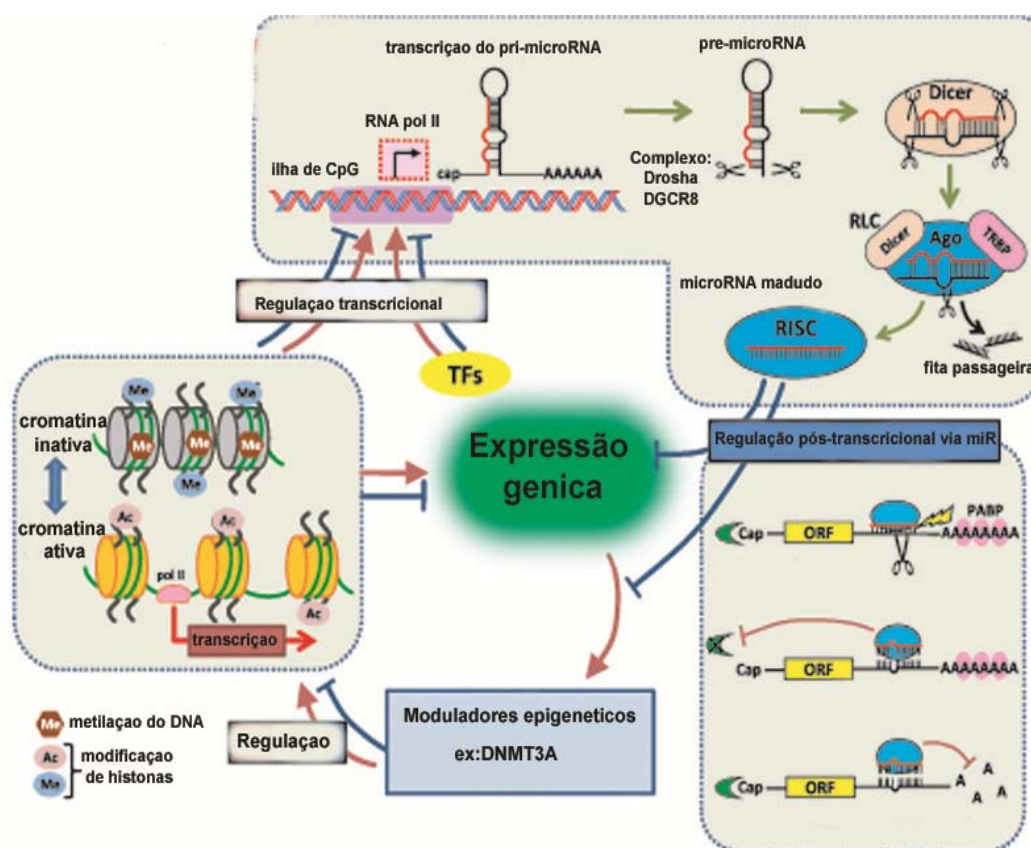


Fonte: Adaptado de PETERSON et al. (2014)

Figura 6 - Esquema da interação entre miR e o mRNA-alvo. Em azul são os nucleotídeos do miR, em vermelho os nucleotídeos responsáveis pelo reconhecimento do mRNA-alvo, chamados de região *seed*.

A modificação pós-transcricional via a ação do miR pode regular a estabilidade de proteínas (LEIVONEN et al. 2013). Além disso, os miRs podem interferir na expressão gênica por meio da regulação gene-alvos que modulam eventos epigenéticos, chamados de miR moduladores epigenéticos. Esse fenômeno é confirmado em carcinoma de mama, no qual inúmeros miRs parecem controlar a hipermetilação e regular a expressão do gene da DNA metiltransferase 3A (*DNMT3A*) (NG et al. 2014), e também a estrutura das cromatinas, por controlarem moléculas modificadoras de histonas, como por exemplo os grupos de genes relacionados ao policombos (conjunto de proteínas repressoras de transcrição) e deacetilases de

histonas (HDAC) (SHEN et al. 2013). Desta forma, esse estudo sugere a existência de um circuito regulatório coordenado por eventos epigenéticos e pelo miR, que se controlam entre si, para a manutenção da função fisiológica normal de um dado organismo (**Figura 7**). Essas evidências mostram que ainda o papel regulatório do miR é complexo e que seu perfil de expressão se encontra alterado em muitas patologias, como o câncer.



Fonte: Adaptado de SATO et al. (2011)

Figura 7 - Circuito regulatório coordenado por eventos epigenéticos e pelos miRNAs. A modificação pós-transcricional via a ação do miR pode regular a estabilidade de proteínas e também a expressão gênica por meio da regulação gene-alvos que modulam eventos epigenéticos, chamados de miR moduladores epigenéticos. A regulação coordenada por eventos epigenéticos e pelos miRNAs permitem a manutenção da função fisiológica normal de um dado organismo.

1.4.2 microRNA no carcinoma de mama

A expressão dos miRs no carcinoma de mama pode variar conforme os subtipos luminal A, luminal B, basal-like e HER-2 (BLENKIRON et al. 2007). CHENG et al. (2009) demonstraram uma baixa expressão de mRNA devido ao efeito regulatório dos miRs em amostras de carcinoma de mama de pacientes com idade > 45 anos com tumores ER+, e esse perfil de expressão gênico se manteve ainda mais reduzido nos casos ER-. Essa evidência sugere que a presença ou ausência do ER pode influenciar na regulação dos miRs, e consequentemente, no perfil gênico (CHENG et al. 2009). Outro estudo baseado na comparação de células com os fenótipos luminal e basal, separadas por microdissecção a laser, oriundas do tecido mamário normal, mostra evidências de 116 miRs capazes de separar o grupo luminal e o basal, sendo 8 miRs identificados como basal (let-7c, miR-125b, miR-126, miR-127-3p, miR-143, miR-145, miR-146b-5p e miR-199-3p) e 6 miRs (miR-135b, miR-200c, miR-21, miR-429, miR-520d-5p, miR-548a-3p) específicos do grupo luminal. Os autores sugerem que o painel de expressão dos miRs nas células epiteliais luminais mamárias normais é distinto, além de refletir em diferentes subtipos do carcinoma de mama (BOCKMEYER et al. 2011). Duas famílias de miRs (miR-200 e miR-221/222) diferencialmente expressas entre o subtipo luminal A e triplo negativo do carcinoma mamário exercem papéis opostos durante a carcinogênese e metástase (HOWE et al. 2012), mostrando mais uma vez a complexidade do papel regulatório dos miRs. Esses achados nos leva a questionar o papel dos miRs nos carcinomas esporádicos ductal invasivo de mama do subtipo luminal de mulheres jovens cuja a mutação nos genes *BRCA1/2* não está presente, uma vez que esses dados não existem na literatura até o presente momento.

A busca de miRs como marcadores moleculares, bem como alvos de tratamentos terapêuticos no carcinoma de mama tem avançado. ADACHI et al. (2011) mostraram em casos de carcinoma de mama do subtipo Her-2+ a influência do miR-205 na sua tumorigênese. O miR-205 interage diretamente com a região 5'UTR dos genes *HER-2-neu*, e a baixa expressão desse miR desencadeia o crescimento desordenado de células tumorais. Desta forma, o miR-205 parece ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento de carcinomas de mama Her-2+ (ADACHI et al. 2011). Além disso, nestes casos foi ressaltada a presença de invasão celular e metástase, principalmente associado com a perda de expressão do gene *PDCD4* (programador da morte celular), pela ação do oncomiR miR-21 (HUANG et al. 2009). O miR-21 foi reconhecido como indicador de agressividade em carcinoma ductal invasivo de mama, uma vez que se apresentou superexpresso em tumores de grau III, com alto índice de proliferação (Ki67 >15%), pacientes com linfonodos axilares metastáticos, e também parece estar associado com menor tempo de sobrevida livre de doença (LEE et al. 2011; OZGÜN et al. 2013; PAN et al. 2014). O papel do miR-21 como oncomiR no carcinoma de mama tem sido explorado principalmente por agir sob os genes *PTEN* e *TGFB1* (supressores de tumor) provocando por sua vez a progressão tumoral em pacientes com idade maior de 40 anos (QIAN et al. 2009; HUANG et al. 2009).

A influência do miR no carcinoma mamário em pacientes com idade inferior a 35 anos foi pouco explorado, no entanto em um estudo com pacientes libaneses foi mostrado que o miR-155 pode ser um biomarcador para este tumor, especialmente em pacientes com status pré-menopausal (NASSAR et al. 2014). Recentemente, nosso grupo publicou um estudo onde foi investigado a diferença de expressão dos

miRs entre numa casuística de 36 tumores de pacientes jovens (< 35 anos) brasileiras pertencentes ao grupo de caso esporádico ou ao grupo com história familiar (hereditário), e ambos não portadores de mutação nos genes *BRCA1/2*. O carcinoma de mama de subtipo luminal, maior grau nuclear e estadiamento menos avançado foram mais frequentes nos tumores de ambos os grupos, sugerindo que existe pouca diferença, em relação às características clinicopatológicas, entre esses dois grupos de pacientes. O perfil de expressão dos miRs foram capazes de diferenciar esses tumores. Neste trabalho foi sugerido 9 miRs (miR-98 124 210, 381,455-3p, 486-3p, 501-5p, 660 e miR-874) como biomarcadores em carcinoma de mama em paciente jovens. Além disso, encontramos gene-alvos com diferença de expressão entre os dois grupos, sendo regulados por esses miRs, sugerindo potenciais pares (miR:gene) que possam explicar mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese do câncer de mama em mulheres jovens com idade ≤ 35 anos, sem antecedentes familiar e não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2* (BASTOS et al. 2014). Semelhantemente, PEÑA-CHILET et al. (2014) demonstraram 6 miRs (miR-1228*, 3196 1275, 92b 139 e miR-1207) capazes de caracterizar os tumores mamários de pacientes jovens não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2*. Desta forma, também concluíram que o agrupamento hierárquico foi dependente da idade e não do subtipo do carcinoma mamário, mostrado mais uma vez a importância dos miRs na caracterização desta doença em mulheres jovens.

1.5 PROTEOMA E CARCINOMA DE MAMA

Proteínas são os últimos efetores das funções celulares necessárias à identificação de biomarcadores em tumores sólidos. Atualmente, várias proteínas são estabelecidas como biomarcadores diagnósticos e prognósticos em carcinoma de mama, como as proteínas ER, PR e HER-2. Além disso, novas proteínas estão sendo determinadas como possíveis alvos terapêuticos, tais como pAKT, pmTOR, EGFR e metaloproteases (GONZALEZ-ANGULO et al. 2011).

Atualmente ainda não está claro como ocorre a regulação das proteínas por meio da ação do miR, que age sob a região 3'UTR do RNA mensageiro correspondente, degradando o mRNA-alvo ou inibindo a tradução, mas relatos comprovam a desregulação de níveis proteico devido a ação do miR (BAEK et al. 2008). LEIVONEN et al. (2009) determinaram em linhagem celular o impacto da ação de vários miRs sob as proteínas chaves para o crescimento do tumor que expressa receptor de estrógeno, sugerindo novos mecanismos moleculares para inibir o crescimento, desenvolvimento e progressão do carcinoma de mama estrógeno-dependente. Recentemente, foi relatada a alteração de expressão dos níveis proteico e gênico de HMGA1 (função de mobilidade celular) em linhagem celular metastática quando super expresso o miR-26a. Esse resultado sugeriu que a interação do miR-26a com o gene e proteína do HMGA1 pode estar associado a carcinogênese da mama, e, por sua vez pode inibir a proliferação celular bloqueando a proteína e gene de HMGA1 (ZHAO et al. 2015). No entanto, é importante ressaltar que os miRs nem sempre atuam sob a região 3'UTR do mRNA-alvo sugerindo uma regulação mais complexa, o que não reflete diretamente na inversão da expressão do miRs em

relação aos níveis de expressão dos mRNA-alvos e proteína-alvos. Por esse motivo, a dificuldade de validar alvos dos miRs. Assim, é importante considerar uma regulação direta e indireta do miR sob os mRNA-alvos e proteína-alvos, buscando uma rede (*network*) de interações (interatoma). SELBACH et al. (2008) vem desenvolvendo muitas metodologias para auxiliar nesses achados.

Ensaio tradicionais de análise de proteínas, incluindo imunohistoquímica e *western blot*, podem acessar apenas um número pequeno de proteínas e são semiquantitativos. O método do RPPA (*reverse phase protein lysate arrays*) permite a determinação quantitativa resultando em um perfil dos níveis e funções de múltiplas proteínas. A metodologia de RPPA consiste na utilização de anticorpos padronizados fixados em uma plataforma onde será incubado com as proteínas totais extraídas das amostras tumorais de forma a realizar uma imunohistoquímica em larga escala. A metodologia foi validada em tumores de mama (HENNESSY et al. 2010) e permitiu a classificação destes carcinomas em grupos prognósticos (GONZALEZ-ANGULO et al. 2011), e também a caracterização do câncer residual após quimioterapia (GONZALEZ-ANGULO et al. 2013) e a relação com o tempo de sobrevida das pacientes (RAGHAV et al. 2012) e a heterogeneidade tissular do tumor (MALINOWSKY et al. 2012). Recentemente, HAYASHI et al. (2014) mostraram que por meio desta metodologia foi possível identificar alteração no nível de expressão de proteínas de tumores de mama em pacientes com linfonodo comprometido e, portanto, foi possível determinar pacientes com predisposição de desenvolver sítio metastático no osso. O miR-30 apresentou ação reguladora sobre as proteínas citocinas IL8, IL6, CXCL1 que resultou na redução da proliferação e invasão celular em linhagem metastática de mama (SHUKLA et al. 2015). Esses

mecanismos promovem a interação de células epiteliais com o estroma tumoral, sugerindo uma grande influência do microambiente na agressividade do carcinoma de mama, e evidentemente, a ação do miR pode estar envolvido nesse processo. Atualmente, pouco se sabe sobre a influência do microambiente tumoral do carcinoma de mama em mulheres jovens, não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2*.

1.6 MICROAMBIENTE TUMORAL E MICRORNA

Carcinomas de mama são também “órgãos” heterogêneos, uma vez que apresentam microambiente tumoral composto por infiltração linfocitária, células endoteliais e células estromais (dos quais fibroblastos, são as mais abundantes) e leucócitos que podem influenciar na progressão deste tumor (KALLURI E ZEISBERG 2006).

Da mesma maneira que as células epiteliais malignas, fontes de fatores que podem ser utilizados como marcadores no câncer, o estroma tumoral contém fatores que potencialmente levam a progressão dos tumores, e desta forma, podem ser utilizados como biomarcadores terapêuticos (FARMER et al. 2009). A co-evolução dos tumores e do seu microambiente envolve comunicações bidirecionais, que atuam na interação entre as células neoplásicas e as células vizinhas do seu microambiente, e conseqüentemente, providenciam fatores cruciais determinantes na permanência, migração, invasão e metástase da célula tumoral (ROZENCHAN et al. 2009).

O estroma tumoral está associado a um grande número de fibroblastos ativos, com produção aumentada de proteínas da matriz extracelular (ECM), tais como

colágenos, proteases, que remodelam a ECM liberando moléculas sequestradas e influenciam na progressão tumoral. Tumores com estádios mais avançados possuem uma população de fibroblastos estromais capazes de induzir angiogênese, secretar inúmeros fatores de crescimento e enzimas, envolvidas com o remodelamento da matriz extra celular, além de reprimir a resposta imune, que normalmente, inibiria o desenvolvimento tumoral (PIETRAS et al. 2008). Portanto, o grau de fibroblastos associados ao carcinoma infiltrante no tumor é correspondente ao alto grau de malignidade e pior prognóstico (KELLERMANN et al. 2008). Ensaio utilizando cultura primária de célula demonstram que os fibroblastos associados ao tumor são funcionalmente e fenotipicamente distintos dos fibroblastos normais (LI e SAE-LIM 2007), especialmente por expressar alfa-actina de músculo liso (POLYAK e KALLURI 2010).

FINAK et al. (2008), por meio da técnica de microdissecção a laser, definiram uma assinatura estromal em carcinomas de mama, identificando 26 genes como preditores de prognóstico, uma vez que influenciaram no tempo de sobrevivência dessas pacientes. Adicionalmente, WENNMALM et al. (2009) mostraram que a identificação de perfil gênico tem influência dos subtipos tumorais.

Os fibroblastos associados ao tumor (derivados da cultura primária) parecem ativar o potencial tumorigênico em células não neoplásicas (FRANCO et al. 2010). ORIMO e WINBERG (2006) mostraram que por meio da sinalização parácrina de fatores de crescimento e quimiocinas produzidas pelos fibroblastos, o processo tumorigênico é ativado. Assim, acredita-se que a diferença entre os tumores em idade jovem e os tumores em idade avançada está no microambiente tumoral e não em fatores intra-tumorais (TICHY et al. 2013). Entretanto, o entendimento da ocorrência

de subtipos mais agressivos em mulheres jovens ainda não está bem elucidado. Os fibroblastos associados ao carcinoma raramente apresentam mutação (QIU et al. 2008). Desta forma, modificações epigenéticas (principalmente por metilação) e regulação pós-transcricional, via miRNA, parecem desempenhar papéis relevantes na regulação da ativação destes fibroblastos (FIEGL et al. 2006). APRELIKOVA et al. (2010) identificaram 11 miRs diferencialmente expressos no microambiente tumoral e mostraram uma menor expressão do miR-31 em cultura primaria de fibroblastos. Além disso, demonstraram que a indução da expressão do miR-31 em fibroblastos associados ao tumor (derivados da cultura primaria) leva a migração e a invasão das células tumorais do endométrio sem alterar a proliferação celular, uma vez que seu gene alvo *SATB2* (gene homeobox envolvido com a remodelação da cromatina) promove a alteração na expressão de um conjunto de genes, como matrix-metaloprotease 3 (*MMP3*), inibidor de tecido-metaloprotease 3 (*TIMP3*), fatores de transcrição (*Runx2* e *ATF4*) e fator de crescimento (*IGF2*), responsáveis pela regulação da motilidade dos fibroblastos associados ao carcinoma. Esses autores também mostraram uma interação recíproca de genes responsáveis pela metástase e angiogênese nessas células (APRELIKOVA et al. 2012). Contrariamente, outros trabalhos demonstram uma relação inversa entre a expressão do miR-31 e o potencial metastático da linhagem celular de mama, MDA-231 (VALASTYAN et al. 2009). Deste modo, atualmente não está claro o papel dos miRs presentes no estroma tumoral no tecido mamário.

No presente estudo, pretendemos esclarecer os mecanismos biológicos sob a regulação dos miRs do carcinoma ductal invasivo de mama de casos esporádicos, classificadas por subtipos luminal em pacientes jovens entre 23-35 anos comparadas

com pacientes com idade entre 50-65 anos, sendo todas não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2*. A identificação dos perfis de expressão gênica e de proteínas sob a regulação dos miRs, que diferem entre carcinomas de pacientes jovens e de meia idade, fornecerá novas informações a respeito das vias biológicas relevantes associadas ao perfil agressivo das pacientes jovens. Além disso, investigar a heterogeneidade diferencial de possíveis biomarcadores poderá complementar o entendimento da carcinogênese nas pacientes jovens. Temos também como objetivo deste trabalho, analisar a diferença do perfil de expressão gênico que possam estar regulador por miRs, advinda do estroma enriquecido de fibroblastos (pelo método de microdissecção a laser) entre pacientes jovens e pacientes de meia idade. A identificação de mRNA-alvos que diferem entre o estroma dos grupos avaliados, pode fornecer novos conhecimentos sobre as mudanças moleculares necessárias para a sobrevivência e o crescimento de células tumorais mamárias no microambiente específico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar miRs diferencialmente expressos em pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama, de casos esporádicos, com baixo risco de apresentar mutação nos genes *BRCA1/BRCA2*, com idade ≤ 35 anos em comparação com uma casuística de pacientes entre 50-65 anos. Complementar com o perfil de expressão gênico e proteico que possam estar regulados pela ação do miR, e, associar características biológicas que possam estar envolvidas com a agressividade do tumor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar em amostras tumorais não microdissecadas os diferentes perfis de miRs, gene-alvos e proteína de pacientes com ≤ 35 anos em comparação com os tumores das pacientes entre 50-65 anos.
- 2 Realizar a busca em “*in silico*” por vias biológicas enriquecidas a partir dos gene-alvos e proteína-alvos regulados diretamente e indiretamente pelo miR.
- 3 Investigar a interação entre miR: mRNA:proteína e sua importância para a carcinogênese por meio de algoritmo de predição e pelo cálculo estatístico não paramétrico.
- 4 Avaliar a expressão de proteína com alto potencial de biomarcador por imunohistoquímica do mesmo grupo de pacientes.

- 5 Obter células do estroma (enriquecido de fibroblastos) por microdissecção a laser de ambos os grupos para analisar o componente estromal por *microarray* e determinar o perfil gênico de ambos os grupos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização deste estudo foram selecionados 52 pacientes entre os anos 2011 a 2014, com critérios clínicos e patológicos para carcinoma ductal invasivo de mama, casos esporádicos, a partir do banco de dados do Banco de tumores do A.C. Camargo Cancer Center, sob a supervisão do Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos, de acordo com as normas de ética aprovadas pelo Comitê. Neste grupo amostral também continha 4 tecidos a frescos congelados cedidos pelo Hospital do Câncer de Barretos.

As pacientes foram divididas em dois grupos: mulheres com idade ≤ 35 anos e entre 50-65 anos. Além disso, as pacientes deveriam preencher os critérios que caracteriza o caso esporádico deste tumor, ou seja, não preencher os critérios de NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e não apresentar antecedentes familiares de primeiro grau ou mais de 2 membros do 2º grau com idade ≤ 35 anos afetadas com esta neoplasia.

Neste estudo o grupo que compreendeu as pacientes com idade ≤ 35 anos, considerada por HAN et al. (2010) uma idade de corte razoável para caracterizar pacientes jovens, foi nomeado como Adulto Jovem (AJ), e o grupo das pacientes com idade entre 50-65 anos foi nomeado como Meia Idade (MI). O grupo AJ foi selecionado por estar provavelmente em estado de pré-menopausa, enquanto, o grupo MI provavelmente apresentavam estados de pós-menopausa. Além dos dados de estado menopausal obtidos nos prontuários das pacientes (por meio da data da última

menstruação, e por pelo menos 3 anos antecedentes á da data da cirurgia), também foi relatada o estado pós-menopausal pela própria paciente, porém não foi realizado teste hormonal para confirmação.

O banco de dados *Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm* (BOADICEA) foi utilizado para calcular a probabilidade de o indivíduo ser portador da mutação nos genes *BRCA1/2* baseado nos dados do heredograma da família: número de indivíduos, idade, óbitos, casos de câncer e idade ao diagnóstico dos indivíduos da família (LEE et al. 2014).

Além destes dados foram coletadas nos prontuários as informações de fatores prognósticos, como o estadiamento (TNM), grau nuclear (GN), grau histológico (GH), índice mitótico (IM), bem como a presença ou ausência de linfonodo (LND) comprometido, e tamanho da lesão.

O estadiamento dos tumores foi classificado de acordo com as recomendações do sistema TNM, sugeridas pelo Sub-Comitê de Registros de Casos de Câncer e Apresentação Estatística, da Organização Mundial da Saúde (OMS) em: I (T1N0M0); IIA (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0); IIB (T2N1M0,T3N0M0); IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0); IIIB (T4N0M0,T4N1M0, T4N2M0); IV (qualquer T, qualquer N e M1). Para avaliação do Índice Mitótico na periferia do tumor, foi contado o número de mitose em 10 campos de grande aumento (CGA (x40)) com um microscópio Nikon, analisando em diâmetro de campo de 0,44 mm e área de campo de 0,152 mm. De acordo com ELSTON e ELLIS (1991), foi conferido o número 0 aos tumores com 0-9 figuras de mitoses por 10 CGA, e o número 1 para as áreas com mais de 10 figuras de mitoses. Além disso, a presença do receptor HER-2 foi avaliada de acordo com os critérios da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO)

(KHATCHERESSIAN et al. 2006), ou seja, as amostras foram submetidas à marcação imunohistoquímica e foram considerados como positivas as amostras classificadas como 3+. Em casos duvidosos (2+), os resultados foram confirmados por FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*), sendo que nos casos 2+ onde não foi possível realizar ou confirmar por FISH a expressão de HER-2 foi considerada negativa. Esta etapa foi realizada com o auxílio da equipe de mama do Departamento de Anatomia Patológica sob a direção do Dr. Fernando Augusto Soares, com o auxílio das alunas de iniciação científica do A.C.Camargo Cancer Center Amanda Duran e Ana Leticia Santos, e com o departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center sob direção da Dra. Isabel Achatz.

Este estudo, considerado retrospectivo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Carmargo Cancer Center sob o número 1656/12 e apresenta um termo de consentimento informado devidamente assinado por todas as pacientes de acordo com as normas do Banco de Tumores desta Instituição.

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes do Banco de Tumor do A.C. Camargo Cancer Center com diagnóstico confirmado de carcinoma ductal invasivo de mama, com subtipo luminal A ou B, com baixo risco de apresentar mutação nos genes BRCA 1/2. A classificação dos subtipos tumorais foi feita de acordo com o modelo proposto por CAREY et al. (2006): subtipo luminal A (ER^{+} e/ou PR^{+} e $HER-2^{-}$, $Ki67 < 10\%$) e subtipo luminal B (ER^{+} e/ou $PR^{+/-}$ e/ou $HER-2^{+/-}$ e $Ki67 \geq 10\%$). Além disso, as pacientes deveriam preencher os critérios que caracteriza o caso esporádico deste tumor, ou seja, não preencher os critérios de NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e não

apresentar antecedentes familiares de primeiro grau ou mais de 2 membros do 2º grau afetadas com idade ≤ 35 anos. Essas pacientes deveriam ser o único membro da família com carcinoma de mama (de primeiro grau) (DE JUAN et al. 2012).

3.1.2 Critério de exclusão

Pacientes com tratamento neoadjuvante, alto risco ($\geq 15\%$) de apresentar mutação nos genes *BRCA1/2* baseado no teste BOADICEA, ou confirmação de mutação pelo sequenciamento e pacientes com dois ou mais familiares de segundo grau com carcinoma de mama diagnosticados com idade < 35 anos foram excluídos deste estudo.

A **Figura 8** representa o fluxograma metodológico adotado neste projeto.

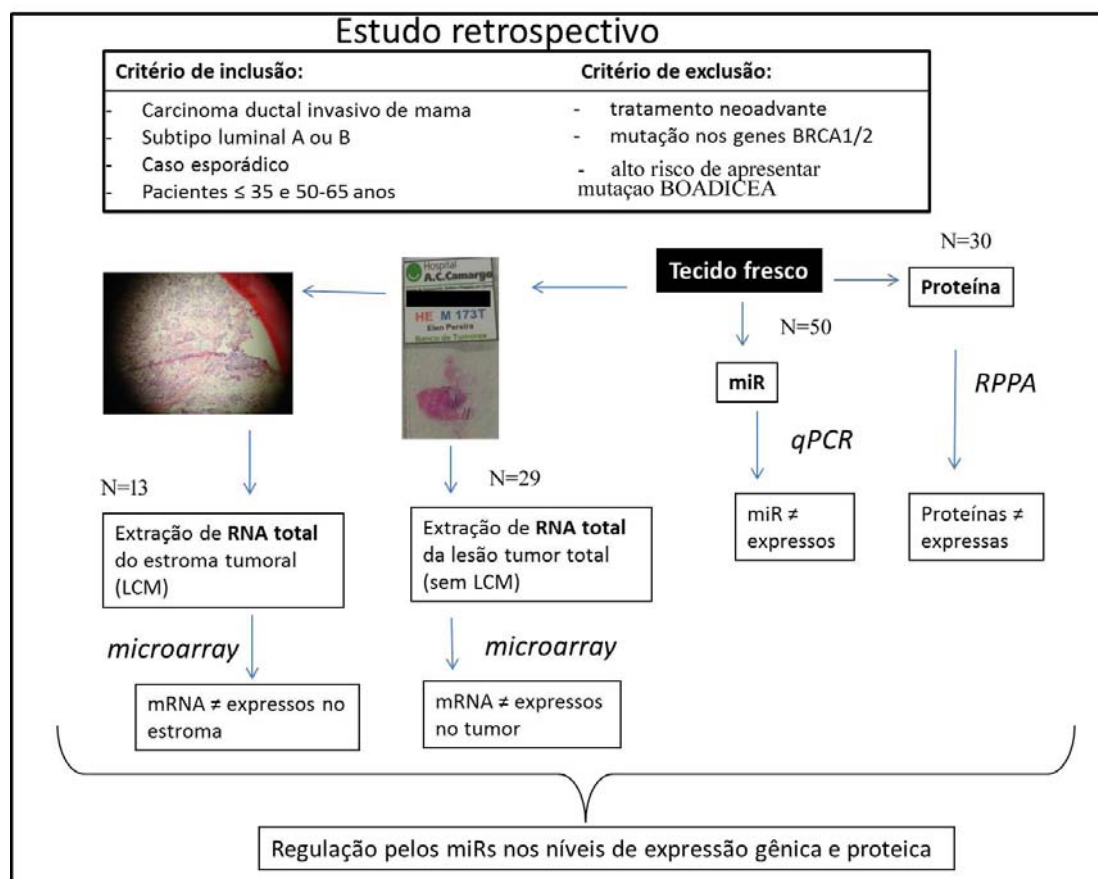


Figura 8 - Esquema do fluxograma metodológico adotado neste projeto.

3.2 ANÁLISES DE MIRS

3.2.1 Extração dos miRs

A extração do miR das amostras tumorais congeladas foi realizada pelo kit miRNAeasy (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante, que favorece os RNAs de tamanho pequeno. Com auxílio de uma coluna adicional do próprio Kit miRNAeasy (QIAGEN) foi realizada a extração favorecendo os RNAs pequenos não codificantes.

Os tecidos congelados foram fragmentados no equipamento com esferas magnéticas *Precellys*® (BioAmerica Inc), seguindo-se a adição de 600 µl de *RLT Buffer* e de etanol 70% (diluído em água DEPC). Após homogeneização, todo o volume foi transferido para a coluna do kit (*RNeasy spin column*). Os próximos passos foram realizados automaticamente no equipamento QIAcube (QIAGEN). Após a centrifugação a 10.000 rpm por 15 segundos, foram adicionados 700 µl de *Buffer RW1* sobre a membrana da coluna, submetida à nova centrifugação (por 15 segundos a 10.000 rpm). Em seguida, foram adicionados 500 µl de *Buffer RPE* (diluído na razão 1:4 em etanol 100%) sobre a membrana, centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm. Foram então adicionados 500 µl de etanol 80% na coluna, centrifugada nas mesmas condições. Os RNAs pequenos purificados foram recuperados da membrana pela adição de 30 µl de água ultra pura, incubando-se a coluna durante 2 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugando-a por 1 minuto a 13.000 rpm. A concentração das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 e 280nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 uV-Vis Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Agilent). Para verificar a integridade do RNA extraído 1 µl de cada amostra foi submetido à leitura no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA)

utilizando o *nano Chip* de pequenos RNAs, e para aquelas que resultaram em pouca quantidade foi analisado o RNA total extraído no mesmo procedimento e consideramos o RIN (*RNA Integrity Number*) ≥ 6 para essa amostra prosseguir no estudo. O RIN é calculado a partir do eletroferograma gerado pelo software do Bioanalyzer no qual considera a distância entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S, bem como a relação 28S/18S. Com o auxílio do programa *Agilent 2100 expert software version B.02.04* foi calculado, para cada amostra, a porcentagem de miRNA na amostra, indicador da integridade do miRNA. Foram consideradas amostras de qualidade satisfatória aquelas com mais de 30 % de miRNAs. Esta etapa foi realizada com o auxílio da equipe do Biobanco de macromoléculas do A.C. Camargo Cancer Center sob a supervisão da Dra. Dirce Carraro.

3.2.2 Determinação dos miRs

A determinação do perfil de expressão do miR foi realizado pelo método de transcrição reversa (RT) PCR quantitativa em tempo real (qPCR) baseando-se no guia MIQE (BUSTIN et al. 2009) no equipamento *7900 PCR System (Life Technology/ThermoFisher)*. A partir do miRNA (100 ng) foi realizada a primeira etapa que consiste na reação de transcrição reversa com o auxílio do kit otimizado *Megaplex™* (Applied Biosystems, número de catálogo # 4399966). Esse kit possui um *pool* de diferentes *primers* (*RT Primers Human Pool A*), sendo que cada um reconhece e é responsável pela transcrição reversa de um miRNA específico. Desse kit, foram utilizados: 0,8 µl de *RT Primers Human Pool A 10x*; 15 µl de *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (50 U/ul)*; 0,8 µl de *Reverse transcription Buffer 10X*; 0,9 µl de dNTPs (100mM); 0,9 µl de MgCl₂ (25 mM); 0,1 µl de inibidor de RNase

(20U/ μ l μ l), completando 50 μ l de volume final. Com o objetivo de aperfeiçoar a quantidade de miRNAs (principalmente dos miRNAs menos expressos), foi realizada uma reação de pré-amplificação, utilizando 2,5 μ l de *Megaplex™ PreAmp Primers Human Pool A10X* e 12,5 μ l de *TaqMan® PreAmp Master Mix 2X* (Applied Biosystems, número de catálogo # 4399233 e # 4391128, respectivamente).

O produto da pré-amplificação foi diluído em 75 μ l de TE 0.1X (pH 8.0) dos quais apenas 9 μ l foram utilizados para a realização da reação de RT-qPCR em tempo real (qPCR), adicionando 450 μ l de *TaqMan 2x Universal PCR Master Mix*, *No AmpErase UNG*), e 441 μ l de água ultra pura. Dessa mistura, apenas 100 μ l foram aplicados em cada uma das 8 canaletas da placa de microRNA *TaqMan® Human microRNA A Array v2.0* (Applied Biosystems, número de catálogo # 4398965). Cada poço na placa continha um par de *primers* liofilizado específico para a amplificação de um determinado miRNA. Como essa placa continha 384 poços, incluindo quatro controles normalizadores, sendo três endógenos em duplicata e um negativo (correspondente a sequências não relacionadas ao genoma de *Homo sapiens*), essa metodologia possibilitou a quantificação de até 377 miRNAs humanos. Após a aplicação das amostras, a placa foi submetida à centrifugação por 2 minutos na rotação de 1.200g e, em seguida, selada para a realização da reação de qPCR de acordo com as sugestões do fabricante. O ensaio *TaqMan microRNA Array assay* está esquematizado na **Figura 9**.

O valor de *ct* (*cycle threshold*) de cada miRNA expresso gerado pelo programa *Real Time SDS® Software* (Life Technology) foi normalizado, através de valores de *ct* das amostras subtraído pelo valor de *ct* de 3 endógenos (*ct* amostra - *ct* endógeno (RNU44, RNU48 e MammU6)) a fim de minimizar o efeito técnico de

bancada e analisar apenas o efeito biológico. O valor de expressão dos miRNAs foram dados utilizando a formula $2^{-\Delta ct}$.

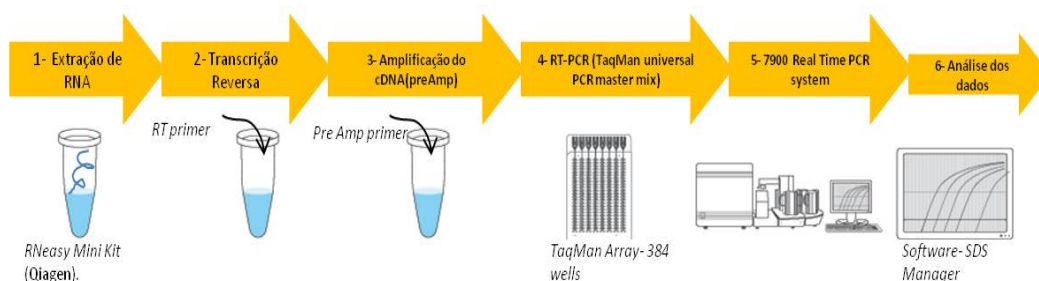


Figura 9 - Esquema da metodologia - sistema *TaqMan microRNA Array Assay* da empresa Life Technology/ThermoFisher.

3.2.3 Análise dos miRs diferencialmente expressos

A análise estatística para identificar os miR diferencialmente expressos foi realizada aplicando um método não paramétrico apresentado por DE CAMPOS et al. (2014) que informa a confiança de a mediana de um grupo ser maior que a de outro grupo, depois de identificar qual grupo pode ter mediana maior. Foi utilizado o pacote *QuOr (Ordering Quantiles)* no programa R.Studio. A afirmação da diferença de expressão resultante da comparação entre os tumores do grupo AJ pelo MI foi considerada significativa quando a confiança resultou em $\geq 90\%$. Essa diferença ocorreu devido ao tamanho de amostra utilizado quando atingiu o valor de corte (*end-point*) determinado para nos dar autoridade estatística na afirmação de maior ou menor expressão. Portanto a interpretação nas análises foram: $AJ > MI$ representou a maior expressão do miR nos tumores do grupo AJ em relação ao MI; enquanto que $AJ < MI$ representou menor expressão do miR nos tumores do grupo AJ em relação ao MI.

3.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA - *MICROARRAY*

3.3.1 Extração do RNA total do tumor

A partir de uma lâmina contendo 10 µm de espessura dos tecidos tumorais de pacientes dos grupos AJ e MI a extração do RNA total foi realizada com o auxílio da patologista (Dra. Cynthia Osório) para assegurarmos que estávamos extraindo tanto células epiteliais como células do estroma no momento do arrasto com a ponta da pipeta. Esse material coletado pela pipeta foi colocado em 40 µl do tampão de extração (*extraction buffer*) do kit *PicoPure RNA Isolation kit (Arcturus)*, e incubado a 42C° por 30 min para lisar as células. Após a centrifugação de 800g por 2 minutos a temperatura ambiente seguimos para o isolamento do RNA total (kit *PicoPure RNA Isolation kit* da *Arcturus*) adicionando 40 µl de Etanol 70% ao extrato celular homogeneizando, o qual o volume resultante foi adicionado na coluna do kit. Após a centrifugação a 100g por 2 minutos, a coluna foi submetida às lavagens utilizando o tampão W1 e W2. Posteriormente o RNA total foi recuperado pela adição de 10 µl de tampão eluente, e encubamos por 1 minuto a temperatura ambiente, em seguida centrifugamos a 1000g por 1 minuto. Após a conclusão do isolamento do RNA total a concentração das amostras foi realizado a sua quantificação determinada pela leitura da absorbância em 260 e 280nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 uV-Vis Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Agilent), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280. O RNA total do tecido fresco tumoral foi então submetido as etapas de amplificação e marcação para realizar o ensaio de *microarray*.

3.3.2 Extração do RNA total do estroma tumoral enriquecido com fibroblastos por microdissecção a laser (LCM)

A partir de 3 a 4 lâminas contendo 10 µm de espessura dos tecidos tumorais congelados oriundos das pacientes dos grupos AJ e MI foi realizado o processo de microdissecção a laser (LCM) com o auxílio do aparelho *laser Pixcell Laser Capture Microdissection System (Arcturus Systems for Microgenomics)*, pertencente ao Departamento de Diagnóstico do A.C. Camargo Cancer Center supervisionado pela Dra. Cynthia Osório (equipe de mama) com o mesmo procedimento descrito por CASTRO et al. (2008). A área do estroma tumoral foi selecionada com o auxílio da patologista para realizar a captura preferencialmente de fibroblastos, denominada de estroma enriquecido (SE). Para cada caso foi estimado o percentual de estroma tumoral presente no corte referente a região da lesão tumoral (células epiteliais). Nesta metodologia (LCM) utilizamos um microscópio invertido, que é acoplado em uma fonte de raio *laser* infravermelho de baixa potência e uma câmera ligada a um monitor e um computador. A lâmina com o corte histológico foi fixada ao *chariot* por um mecanismo de sucção a vácuo e o feixe de raio *laser* incidiu sobre um *cap* revestido por um filme termoplástico. O *cap* fica posicionado entre o feixe de *laser* e o corte histológico. Com a incidência do feixe de *laser* (tiro) sob o filme termoplástico o mesmo se expande e adere à célula escolhida. Ao final da operação retiramos o *cap* com as células e seguimos para o isolamento do RNA total. Para obtenção da quantidade suficiente de SE para o experimento de *microarray*, a captura do material foi realizada utilizando de 3 a 4 *caps* para cada caso.

Da mesma forma que foi extraída o RNA total, também foi utilizado o kit *PicoPure RNA Isolation kit da Arcturus* para isolar o RNA total conforme o

protocolo do fabricante. Após a extração, a concentração do RNA total foi determinada pela leitura da absorbância em 260 e 280nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 uV-Vis Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Agilent), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280. O RNA total do SE foi então submetido as etapas de amplificação e marcação para realizar o ensaio de *microarray*.

3.3.3 Amplificação e marcação do RNA mensageiro

Utilizando o protocolo de amplificação do fabricante *Arcturus* (# 02102012) foi amplificado o RNA dos grupos AJ e MI oriundos do estroma tumoral cuja população dos fibroblastos foi enriquecida pelo método de *LCM*, bem como dos tecidos tumorais que não foram submetidos ao *LCM*. Além disso foi amplificado a referência universal que contem vários RNAs (*pool*) provenientes de diferentes tecidos derivados de linhagens celulares de humanos (*Universal Human Reference RNA* cat. 740000, Agilent Technologies) o que permitiu realizar o ensaio de *microarray* com o protocolo de duas cores (*two-colors*) no qual permite o monitoramento e controle das variações intra e inter-experimental. A etapa de amplificação foi realizada em 2 etapas (*2 rounds*).

No mínimo 100 pg de RNA total extraído dos tecidos (célula epitelial e célula estromal enriquecida de fibroblastos) obtido por microdissecção a laser (*LCM*) foram amplificados utilizando o kit *RiboAmp HSPlus2-round* da forma que se segue descrita. Uma primeira fita de cDNA foi sintetizada inicialmente adicionando *Spike A* (Referencia, *Stratagene Universal RNA reference*) ou *Spike B* (amostras), os quais incluem distintas sequências sintéticas de Adenovirus E1A, os quais permitem

monitorar a performance do processo de amplificação. Os *Spikes* foram diluídos de acordo com a concentração inicial de RNA total. 2ul do spike apropriado mais 1uL de Primer1 foram adicionados a 8ul do RNA total e foram incubados por 5 minutos a 65°C, 9ul de uma mistura para síntese da primeira fita (tampão, enzimas, *enhancer* para reação de 1ª fita de cDNA e SuperScript TM III) foi adicionada e ao término da incubação de 42°C por 1 hora o RNA residual foi eliminado do cDNA obtido pela adição de RNase (37°C por 30 minutos seguidos de 95°C por 5 minutos). A segunda fita de cDNA foi sintetizada a partir do cDNA primeira fita obtido no passo anterior pela adição de 1ul de Primer 2 e após incubação por 2 minutos a 95°C. Nesta reação foi adicionado 30ul de mistura para segunda fita contendo tampão e enzimas que foi incubada: 25°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos, 70°C por 5 minutos. A purificação do cDNA foi realizada utilizando coluna tratada com tampão de ligação para DNA e posteriormente eluído com tampão apropriado.

Para a transcrição *in vitro* foi adicionando a 10ul de cDNA purificado 12ul de uma mistura com tampão, nucleotídeos, enzimas e *enhancer* para reação de transcrição *in vitro*. Após a incubação a 42°C por 6 horas o RNA complementar (RNAc) da primeira etapa será adicionado DNase a 37°C por 15 minutos e os RNAc livre de DNA será purificado utilizando coluna tratada com tampão de ligação para RNA e eluído com tampão apropriado. A segunda etapa de amplificação foi iniciada pela síntese de cDNA 1ª fita a partir do RNAc obtido. Na síntese da 1ª fita de cDNA o Primer1 será substituído pelo Primer2 e a reação ocorreu como descrito para a síntese de primeira fita de cDNA da 1ª etapa. Para a síntese da 2ª fita de cDNA o Primer 2 foi substituído pelo Primer 3 e a reação e a purificação ocorreu como descrito para a síntese de segunda fita de cDNA da 1ª etapa. A transcrição *in vitro* foi

realizada com *kit in vitro transcription* (IVT, Agilent) a partir do cDNA obtido da segunda rodada de amplificação. Em 15ul de cDNA será acrescentado 9ul de uma mistura com tampão, enzimas, nucleotídeos e (Cy-3) cianina-3, para obter um RNAc referência ou (Cy-5) cianina-5, para marcar as amostras. Após incubação de 40°C por 2 horas o RNAc marcado com a cianina apropriada (Cy-3(RNAc referencia) e Cy-5 (amostra) foi purificado em coluna e eluído com água livre de RNase. O rendimento e a pureza do RNAc amplificado será realizada avaliando as absorbâncias 260 e 280 nm utilizando um NanoDrop espectrofotômetro. Esta quantificação é necessária para a determinação da quantidade de cRNA a utilizar na hibridação. A concentração de Cianina e do RNAc são os parâmetros importantes nesta fase, pois só amostras que apresentam um rendimento superior a 0,825 ug e uma atividade específica entre $7,0 < \text{atividade da cianina} < 15$ foram utilizadas para a hibridação. A determinação do rendimento e atividade específica foi calculado com indicado a seguir:

$$\text{Rendimento em ug de cRNA} = \frac{[\text{cRNA}] \times \text{volume } \mu\text{l}}{1000}$$

$$\text{Atividade específica (pmol Cy)} = \frac{[\text{Cy}] \times 1000}{\text{cRNA}}$$

Para hibridização os RNAc foram fragmentados para tamanhos entre 35 e 200 bases. Assim, para 300ng de RNAc foi adicionado proporcionalmente tampão de fragmentação e incubado a 60°C por 10 minutos. RNAc marcados foram hibridizados utilizando a lâmina *Agilent G485 -1 Super Print G3Hmn* (Agilent, Santa Clara, USA), por 20 horas a 10 rpm and 65°C. Este procedimento foi realizado em forno de hibridização *Hybridization Oven 640* (Agilent). Após hibridização as lâminas foram lavadas e depois a captação de imagem foi realizada em scanner com resolução 5μ em

um sistema Agilent G2565BA Microarray Scanner. A imagem foi visualizada e intensidade de sinal serão extraídas e pré processada usando o Agilent Feature Extraction Software (v9.1).

Esses procedimentos foram realizados no equipamento da *Agilent* presente no CIPE (Centro Internacional de pesquisa e ensino) do A.C. Camargo Cancer Center aos cuidados da equipe da Dra. Dirce Carraro, com o apoio da Dra. Rosimeire A. Roela do departamento de oncologia da Faculdade de medicina da USP.

3.3.4 Análise do perfil de expressão gênico

A partir do dado bruto de expressão foi realizada a exclusão dos controles internos de ruído (*background*), exclusão dos genes que não apresentaram expressão em mais de 30% das amostras do grupo de estudo, para realizar o cálculo da média das replicas das *probes*. Os dados de expressão foram transformados em $\log_2$ (g/r) e aplicados o pacote LIMMA no programa R estatístico (R Development Core Team 2008). O processo de normalização foi realizado pelo Renato D. Puga do Hospital Israelita Albert Einstein de São Paulo.

Neste trabalho foi adotado o termo mRNA-alvos regulados diretamente ou indiretamente pelo miR para os casos que apresentaram $\geq 80\%$ de confiança de expressão diferenciada pelo ensaio de *microarray* cuja predição foi dada em 3 ou mais banco de dados.

3.3.5 Determinação dos mRNAs diferencialmente expressos

A análise estatística para identificar os mRNA diferencialmente expressos foi realizada aplicando o mesmo método descrito no item 3.2.3. A afirmação da

diferença de expressão resultante da comparação entre os tumores do grupo AJ pelo MI foi considerada significativa quando a confiança resultou em $\geq 80\%$.

Na análise de classificação das amostras foi considerada as combinações dos genes, definidas como maior ou menor expressão, em relação ao grupo AJ, em pares (maior/menor) resultando em uma combinação classificatória (MARQUES e PEREIRA 2014). Com a combinação determinada foi definido um novo valor de corte para classificarem-se quais dos grupos pertencem as pacientes. Para uma validação deste novo valor de corte classificatório cruzou-se classificação com observações efetivas (BRENTANI et al. 2011). Esses classificadores foram considerados relevantes quando apresentaram $\geq 80\%$ de acerto na distribuição das amostras do grupo AJ e do grupo MI.

3.4 ANÁLISE PROTEICA – MÉTODO *REVERSE PHASE PROTEIN ARRAY (RPPA)*

3.4.1 RPPA

Para a extração proteica utilizamos o protocolo estabelecido pelo *RPPA Core Facility - Functional Proteomics* do MD Anderson Cancer Center (Houston, TX, USA). Este experimento permitiu a análise da expressão de proteínas com possível relevância clínica em câncer de mama, principalmente relacionadas com vias de sinalização, tais como a via do AKT, MAP kinase, ciclo celular e apoptose, as quais constam na plataforma de *RPPA do MD Anderson*. O ensaio de *RPPA* foi realizado no *RPPA Core Facility- Functional Proteomics* do MD Anderson Cancer Center no departamento de Sistema Biológico (Houston, TX, USA). Essa etapa do trabalho foi

realizada em colaboração com a pesquisadora Dra. Ana Maria Gonzalez-Angulo, M.D., M.Sc Chief, e Dra. Adriana Trapé, do Section of Clinical Research and Drug Development, Dept. do Breast Medical Oncology, Dept. de Systems Biology, The University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center. Detalhes da metodologia da análise quantitativa proteômica em carcinoma de mama foram previamente descritos (HENNESSY et al. 2010; TABCHY et al. 2011). Para determinação da concentração das proteínas totais uma curva padrão com BSA foi realizada em triplicata e com leitura da absorbância em 595 nm. Esta etapa do projeto foi aprovada pelo CEP do MD. Anderson Cancer Center (nº parecer 437/260) (Anexo 1)

A análise estatística dos resultados foi realizada em colaboração com o departamento de Psiquiatria da Universidade de São Paulo coordenada pela Dra. Helena Brentani, com o Departamento de Estatística da Universidade Federal de São Carlos pelo Adriano Polpo coordenado pelo Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

Neste trabalho foi adotado o termo miRNA-proteína para aquelas proteínas que apresentaram $\geq 80\%$ de confiança de expressão diferenciada pelo ensaio de *microarray* e exibiram preditivamente miRs reguladores direto ou indiretamente uma vez que seus correspondentes genes foram preditos em 3 ou mais banco de dados.

3.4.2 Imunohistoquímica

Para validar proteínas com potencial para biomarcador para o carcinoma de mama em mulheres com idade ≤ 35 anos adotamos a estratégia de imunohistoquímica em microarranjo de tecido (TMA). A construção da lâmina de TMA foi realizada a partir dos blocos de parafina de amostras tumorais de pacientes

com idade ≤ 35 anos e entre 50-65 anos que seguiram nossos critérios: subtipo do tumor luminal; CDI; sem historia na família de carcinoma mamário em membros de 1º grau. As áreas tumorais foram selecionadas cuidadosamente por um patologista (Dr. Antônio Hugo Campos) e foram fixadas em um bloco de parafina porções em triplicata das áreas tumorais das pacientes selecionadas. Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo rotativo na espessura de 5 μ m e o corte foi aderido a lamina previamente tratada (Amitel, cat# CMS-2, São Paulo). Em seguida as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C para secagem e sofreram banho de parafina para o armazenamento. A primeira lâmina (de corte superior) e a última lâmina (de corte mais profundo) foram analisadas com marcação de hematoxilina-eosina (HE) para verificação da representação do tumor nas lâminas de TMA. A construção do TMA foi realizada em colaboração com o Dr. Antônio Hugo, Carlos e Dr. Victor Piana do A.C. Camargo Cancer Center.

3.5 ANÁLISES *IN SILICO* DA INTERAÇÃO ENTRE MIRS, MRNAS E PROTEÍNAS

3.5.1 Predição da interação dos mRNA-alvos e miRs

Após identificar os miRs diferencialmente expressos, gene-alvos foram avaliados *in silico* pelo banco de dados de predição miRWalk (DWEET et al. 2011), que integra os resultados com outros banco de dados como: TargetScan, RNA22, DIANAmt, miRanda, miRBD, PITA e PicTar. O miRWalk permite submeter os seus miRs de interesse no entanto pode ocorrer de não encontrar o miR derivado do braço exato que foi solicitado, portanto foi considerado todos os miRs maduros da espécie

humana (hsa) e percursores de ambos os braços (3p,5p e miR*). Foram utilizados no miRWalk os parâmetros do microT-CDs cujo os critérios são: (a) complementariedade perfeita da região 5' "seed" 6-8nt (nucleotídios) do miRNA com a sequência da região 3' do RNA mensageiro; (b) sequência do alvo conservada entre espécies; (c) forte estabilidade termodinâmica do miRNA-RNA *duplex* (ligação entre as duas moléculas); (d) comparação entre múltiplos sítios por proximidade; (e) existência da região não-pareada na porção central da ligação miRNA:RNA *duplex* (*loop*). O gene-alvo cuja predição foi dada em 3 ou mais banco de dados teve como conceito o nome de mRNA-alvos preditos.

3.5.2 Identificação de vias biológicas enriquecidas a partir dos mRNA-alvos e das proteínas

A análise de vias biológicas enriquecidas relacionadas aos mRNA-alvos e às proteínas foi realizada pelo banco de dados *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit* (WebGestalt) (ZHANG et al. 2005; WANG et al. 2013). O WebGestalt baseia-se nos banco de dados KEGG, Pathway Commons e WikiPathways cuja identificação dos genes ou proteínas submetidas no banco é dada pelo NCBI GENE, GEO, Ensembl, MGI e SGD. Os critérios utilizados para o enriquecimento de vias biológicas foram baseados no mapeamento de genes ou proteínas no genoma humano utilizando o *Gene Symbol*; teste estatístico pela hipergeometria; apresentando valor significativo ($p \leq 0,05$); MTC: BH, e representação de pelo menos 2 *Gene Symbols* por via. As classificações foram fundamentadas em (C) número de genes na categoria referente; (O) número de genes computado por categoria; (E) número esperado na categoria; (R) razão do enriquecimento; (rawP) P valor do teste hipergeométrico; (P) p valor

ajustado pelo teste múltiplo de ajustamento. Esse enriquecimento evita a ambiguidade dos dados computados no WebGestalt.

3.5.3 Interação proteína-proteína (Interatoma)

A análise do interatoma foi realizada utilizando o programa iRefIndex que integra outros banco de dados de interação tais como BINDI, BioGRID, CORUM, DIP, HPRD, InTact, MINT, MPact, MPPI e OPHID. Nesta análise proteína-proteína consideramos vários tipos de interação, incluindo física e genética (mapeados para os seus produtos de proteína correspondentes), como determinado por uma multiplicidade de métodos. Este índice permite ao usuário procurar uma proteína e recuperar uma lista não redundante de interagentes para essa proteína, cuja interação é de 1º nível, ou seja, proteína que se interage diretamente com outra proteína sem a necessidade de outros complexos proteicos.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICOS

O programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL) foi utilizado para a análise estatística dos dados clínicopatológicos para descrever as frequências e discriminar as diferenças significativas entre os tumores do grupo AJ e MI baseado no teste do Qui-quadrado. Além disso, foi analisado a relação entre a expressão dos miRs com as características clínico patológicas dos tumores (grau nuclear e histológico, tamanho da lesão e TNM) utilizando a curva ROC (*receiver-operating characteristic*) e a área a baixo da curva ROC (AUC), posteriormente aplicado o teste de Qui-quadrado. A expressão dos miRs foi categorizada em positivo (≥ 1) e negativo (≤ 0) usando a mediana para determinar o corte ou valor ajustado pela curva ROC. Todas as análises que resultou no valor de $P \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

É importante esclarecer sobre a dificuldade na obtenção das amostras para esse estudo, pois embora exista uma estimativa grande de cirurgias de carcinoma de mama por ano (prox. 3.000) no A.C. Camargo Cancer Center, as peças cirúrgicas não são suficientemente grandes para serem armazenadas no Banco de Tumores após o envio do material para a análise anatomopatológica, além disso, os casos de carcinoma de mama em pacientes com idade precoce representam apenas 2% do total dos casos. Desta forma a casuística deste trabalho foi composta por 52 amostras de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama com característica luminal (ER positivo), sendo 27 amostras tumorais do grupo de pacientes com idade entre 23 a 35 anos, denominado como grupo “Adulto Jovem” (AJ), e 25 amostras tumorais do grupo de pacientes com idade entre 50 a 65 anos, nomeado de grupo “Meia Idade” (MI). O valor mediano da idade das pacientes foi de 31 anos (mínimo 23; máximo 35 anos) no grupo AJ e 57 anos (mínimo 50; máximo 64) no grupo MI. Os dados clínicopatológicos dessas amostras estão listados no **Quadro 1**.

Os receptores hormonais (HR) foram avaliados por imunohistoquímica, sendo que a presença de receptor de estrógeno (ER) e receptor de progesterona (PR) foi considerada positiva quando mais de 10% das células tumorais expressavam os respectivos antígenos. A presença dos receptores ER, PR e HER-2 e Ki67 foram representados positivamente em 32 casos, e somente 5 casos não foi determinada a expressão. A expressão para citoqueratina se apresentou negativamente para todos os casos analisados.

Quadro 1 - Dados anatomopatológicos das pacientes nos grupos AJ e MI (N=52).

Idade	Identificação amostras	Grau	TNM	subtipo	ER	PR	HER-2	Ki 67	citoceratina 5/6 e 14
Grupo Adulto Jovem (AJ)									
28	BC-AJ-28	GN3 GH3	II	Luminal A	POS (50%)	POS (20%)	NEG	NEG	NA
31	BC-AJ-30	GN 3 GH 3	III	Luminal A	POS	POS (70%)	NEG	NEG	NEG
35	BC-AJ-33	GN 2 GH 1	I	Luminal B	POS (30%)	POS (50%)	NEG	POS (20%)	NEG
31	BC-AJ-35	GN 3 GH 3	III	Luminal B	POS (80%)	POS (80%)	POS +++	POS (30%)	NEG
29	BC-AJ-40	GN 3 GH 3	III	Luminal B	POS (50%)	POS (70%)	POS +++	POS (80%)	NEG
34	BC-AJ-41	GN 3 GH 3	III	Luminal A	POS (70%)	POS (70%)	POS++/FISH não amplificado	NEG	NEG
34	BC-AJ-118	GH1 GN3	I	Luminal A	POS (80%)	POS (90%)	POS++/ FISH não amplificado	NEG	NEG
29	BC-AJ-120	GN 3 GH 3	IIB	Luminal B	POS (75%)	NEG	POS++ /FISH não amplificado	POS (30%)	NEG
34	BC-AJ-122	GN 3 GH 3	II	Luminal B	POS (80%)	POS (50%)	POS +++	POS (60%)	NEG
33	BC-AJ-173	GN3 GH3	IV	Luminal B	POS (90%)	POS (50%)	NEG+	POS (60%)	NA
34	BC-AJ-174	GH3 GN3	I	Luminal B	POS (80%)	POS (30%)	NEG	POS (10%)	NEG
33	BC-AJ-175	GN3 GH3	I	Luminal B	POS (70%)	POS (90%)	POS++/ FISH não amplificado	POS (20%)	NA
32	BC-AJ-176	GH3 GN3	IV	Luminal B	POS (80%)	POS (60%)	NEG	POS (30%)	NEG
32	BC-AJ-195	GN 1 GH 1	I	Luminal B	POS (95%)	POS (20%)	NEG	POS (20%)	NEG
34	BC-AJ-206	GN3 GH2	II	Luminal A	POS (70%)	POS (90%)	NEG	NEG	NA
29	BC-AJ-226	GH 2 GN 3	II	Luminal B	POS	POS	NEG	POS (30%)	NA
35	BC-AJ-1004	GH 2	IIA	Luminal B	POS	POS	POS ++ /FISH	POS (20%)	NEG

		GN 3					amplificado		
26	BC-AJ-2036	GN 3 GH 2	IV	Luminal B	POS	POS	POS +++	POS (50%)	NA
29	BC-AJ-4011	GH2	I	Luminal B	POS	POS	POS +++	NA	NEG
31	BC-AJ-4015	GH2	IIIA	Luminal A	POS	POS	NEG	NA	NEG
33	BC-AJ-4019	GN2 GH1	IIA	Luminal A	POS	POS	NEG	NA	NA
30	BC-AJ-4025	GH2	IIIB	Luminal A	POS	POS	NEG	NA	NEG
28	BC-AJ-4028	GN2 GH2	IIA	Luminal A	POS	POS	NEG	NA	NEG
28	BC-AJ-329	GN 3 GH3	II	Luminal B	POS	NEG	POS +++	POS (40%)	NEG
23	BC-AJ-330	GN 2 GH3	II	Luminal B	POS (80%)	POS (20%)	NEG	POS (80%)	NEG
24	BC-AJ-334	GN 3 GH 3	IIIA	Luminal B	POS	POS	NEG	POS (60%)	NEG
34	BC-AJ-337	GN 3 GH 3	II	Luminal B	POS	POS	POS ++	POS (40%)	NEG
Grupo de Meia Idade (MI)									
61	BC-MI-42	GN2 GH2	I	Luminal A	POS (80%)	POS (10%)	NEG	NEG	NEG
50	BC-MI-43	GN2 GH1	I	Luminal A	POS (90%)	POS (20%)	NEG	NEG	NEG
56	BC-MI-44	GH 2 GN 3	II	Luminal B	POS (90%)	POS (90%)	NEG	POS (10%)	NEG
56	BC-MI-45	GN 2 GH 2	I	Luminal A	POS (80%)	POS (30%)	NEG	NEG	NEG
54	BC-MI-47	GN1 GH1	I	Luminal A	POS (90%)	POS (90%)	NEG	NEG	NEG
54	BC-MI-48	GN3 GH3	II	Luminal B	POS (90%)	POS (90%)	NEG	POS (20%)	NEG
62	BC-MI-49	GN3 GH2	II	Luminal B	POS (20%)	NEG	NEG	POS (60%)	NEG
59	BC-MI-50	GN3 GH2	I	Luminal A	POS (10%)	POS	NEG	NEG	NEG
61	BC-MI-52	GN2 GH2	II	Luminal A	POS (80%)	POS (10%)	NEG	NEG	NA

58	BC-MI-53	GN3 GH3	IV	Luminal A	POS (50%)	POS (40%)	NEG/ FISH não amplificado	NEG	NA
59	BC-MI-54	GN2 GH2	I	Luminal A	POS (100%)	POS (20%)	NEG	NEG	NEG
52	BC-MI-125	GN2 GH 2	II	Luminal A	POS (90%)	NEG	NEG	NEG	NEG
55	BC-MI-126	GH2 GN3	II	Luminal B	POS (90%)	NEG	2++ / FISH não amplificado	POS (15%)	NA
54	BC-MI-128	NA	II	Luminal B	POS (60%)	POS (30%)	POS ++	POS (10%)	NA
55	BC-MI-129	GN 2 GH 1	I	Luminal B	POS (90%)	POS (90%)	NEG	POS (10%)	NA
53	BC-MI-130	GN 3	II	Luminal B	POS (90%)	NEG	NEG	POS (50%)	NA
59	BC-MI-133	NA	I	Luminal B	POS (95%)	POS 80%	NEG	POS (14%)	NA
63	BC-MI-134	GN2 GH2	II	Luminal B	POS (80%)	POS (40%)	POS ++	POS (10%)	NA
57	BC-MI-178	GH3 GN3	II	Luminal B	POS (90%)	POS (30%)	NEG	POS (25%)	NEG
60	BC-MI-179	GN3	I	Luminal B	POS (90%)	POS (65%)	POS	POS (20%)	NEG
61	BC-MI-181	GH2 GN3	II	Luminal B	POS (80%)	POS (20%)	NEG	POS (10%)	NA
56	BC-MI-186	GH 3 GN 3	II	Luminal A	POS (80%)	POS (30%)	POS++ /FISH não amplificado	NEG	NEG
55	BC-MI-198	GN2	II	Luminal B	POS (100%)	POS	2++ / FISH não amplificado	POS	NEG
62	BC-MI-276	GN3 GH2	III	Luminal B	POS (100%)	POS (20%)	NEG	POS (70%)	NA
53	BC-MI-314	GN 2	I	Luminal B	POS (70%)	POS (90%)	NEG	POS	NA

1: POS = positivo; NEG = negativo; GN = grau nuclear; GH = grau histológico; ER = receptor de estrogênio; PR = progesterona; HER-2 = receptor de fator de crescimento; tipo 2 (O teste HER2 pelo método imunoistoquímico deste laboratório é auditado pelo CAP (College of American Pathologist) e pelo UKNeqas – ICC & FISH; FISH não amplif= HER-2 não amplificado por FISH. London. United Kingdom desde 2007.); KI 67 = nível de proliferação em células neoplásicas (MIB-1 - DAKO); ck5/6 e 14 = citoceratinas.

*2: A classificação dos tumores foi feita de acordo com o modelo proposto por Carey et al. (2006): subtipo luminal A (ER⁺ e/ou PR⁺, HER-2⁻, Ki67 <10%); subtipo luminal B (ER⁺ e/ou PR⁺ e HER-2⁺; ou HER-2⁻ e Ki67 ≥10%).

*3: Os tumores também foram classificados em estádios de acordo com as recomendações do sistema TNM, sugeridas pelo Sub-Comitê de Registros de Casos de Câncer e Apresentação Estatística, da Organização Mundial da Saúde (OMS): I (T1N0M0); IIA (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0); IIB (T2N1M0,T3N0M0); IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0); IIIB (T4N0M0,T4N1M0, T4N2M0); IV (qualquer T, qualquer N e M1).

As amostras de tecidos tumorais congelados (N=52) foram analisadas pelo Departamento de Anatomopatológica do A.C. Camargo Cancer Center antes da realização da extração do RNA total. Estes tumores foram classificados em: carcinoma ductal invasivo apresentando 60 a 100% da amostra com desmoplasia discreta (DD), moderada (DM) a intensa (DI), infiltrado inflamatório discreto (IID) a acentuado (IIA) e necrose focal, discreta (NFD) ou ausente (NFA). Alguns casos apresentaram borda (5% a 10%) de tecido mamário não neoplásico separável ou não, sendo possíveis em alguns destes casos realizar a dissecação manual antes da extração do RNA total do tecido congelado (**Quadro 2**).

Quadro 2 - Características clinicopatológicas das amostras tumorais dos grupos AJ e MI.

Identificação amostras	Anatomopatológica
Grupo Adulto Jovem (AJ)	
BC-AJ-28	Carcinoma ductal invasivo em 95% da amostra com DM, IID e NFA. Borda de 5% de tecido mamário não neoplásico não separável.
BC-AJ-30	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra com DM, IID e NFA.
BC-AJ-33	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra com DM, IID e NFA.
BC-AJ-35	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra. DM, IID e NFD. 10% de borda de tecido não neoplásico. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico.
BC-AJ-40	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra com DM, IID e NFA. (BIÓPSIA)
BC-AJ-41	Carcinoma ductal invasivo em 95% da amostra com DM, IID e NFA. Borda de 5% de tecido mamário não neoplásico não separável.
BC-AJ-118	Carcinoma ductal invasivo em 60% da amostra, DM, IID e NFA. Carcinoma ductal <i>in situ</i> em 30% da amostra. 10% de borda de tecido mamário não neoplásico separável. Foi retirado por dissecação manual o tecido mamário não neoplásico.
BC-AJ-120	Carcinoma ductal invasivo em 50% da amostra com áreas mucosecretoras (20% de neoplasia e 80% de muco). 50% de borda de tecido mamário não neoplásico separável. Foi retirado por dissecação manual o tecido mamário não neoplásico.
BC-AJ-122	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra, DM, IIM e NF. 5% de tecido mamário não neoplásico, não separável. 5% de borda de tecido mamário não neoplásico, não separável. Foi retirado por dissecação manual o tecido mamário não neoplásico.
BC-AJ-173	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra. DM, IID e NFD. 10% de borda de tecido não neoplásico. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico.
BC-AJ-174	Carcinoma ductal invasivo em 95% da amostra com DM, IID e NFA. Borda de 5% de tecido mamário não neoplásico não separável.

Cont/ Quadro 2

BC-AJ-175	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra com DI, IID e NFD.
BC-AJ-176	Carcinoma ductal invasivo em 95% da amostra com DM, IID e NFA. Borda de 5% de tecido mamário não neoplásico não separável.
BC-AJ-195	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFA.
BC-AJ-206	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFA.
BC-AJ-226	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFA.
BC-AJ-1004	Ca ductal invasivo em 95% da amostra e ca ductal in situ em 5% da amostra, com DD, IIA e NFA. Presença de tecido normal em 5% da amostra (pequena borda).
BC-AJ-2036	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra com DI, IID e NFD.
BC-AJ-4011	Carcinoma ductal invasivo em 70% da amostra e carcinoma ductal in situ em 30% da amostra com DM, IID e NFD.
BC-AJ-4015	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra com DD, IID e NFD.
BC-AJ-4019	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra e carcinoma ductal in situ em 10% da amostra com DM, IID e NFD.
BC-AJ-4025	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra. DD, IID e NFA.
BC-AJ-4028	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra e carcinoma ductal in situ em 10% da amostra com DM, IIM, NFD.
BC-AJ-329	Carcinoma ductal invasivo em 80% da amostra, DD, IID e NFA. 20% tecido mamário não neoplásico e não separável.
BC-AJ-330	Carcinoma ductal invasivo em 95% da amostra, DM, IID e NFA. 5% Carcinoma ductal in situ.
BC-AJ-334	Carcinoma ductal invasivo em 70% da amostra, DD, IIA e NFA. 30% de borda de tecido mamário não neoplásico. Foi retirado por dissecação manual a borda de tecido mamário não neoplásico.
BC-AJ-337	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra, DM, IID e NFA. 10% de borda de tecido mamário não neoplásico. Foi retornado por dissecação manual a borda de tecido mamário não neoplásico
Grupo de Meia Idade (MI)	
BC-MI-42	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DM, IID e NFA. Menos de 5% de tecido mamário não neoplásico, não separável.
BC-MI-43	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-44	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFA.
BC-MI-45	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra. DD, IID e NFA. 10% de esteatonecrose, não separável.
BC-MI-47	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra. DM, IID e NFD. 10% de borda de tecido não neoplásico.
BC-MI-48	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-49	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DA, IID e NFA.
BC-MI-50	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico e ca.in situ
BC-MI-52	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFA.
BC-MI-53	Carcinoma ductal invasivo em mais de 90% da amostra. DD, IIM e NFA. 10% de borda de tecido não neoplásico. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico.
BC-MI-54	Carcinoma ductal invasivo em mais de 90% da amostra. DD, IIM e NFA. 10% de borda de tecido não neoplásico. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico.

Cont/ Quadro 2

BC-MI-125	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-126	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-128	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-129	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-130	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IIM e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-133	Carcinoma ductal invasivo em 70% da amostra, DD, IID e NFA. 30% de borda de tecido mamário não neoplásico separável. Foi retirado por dissecação manual o tecido mamário não neoplásico.
BC-MI-134	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFA.
BC-MI-178	Carcinoma ductal invasivo em mais de 95% da amostra. DD, IID e NFA. Menos de 5% de carcinoma in situ, não separável.
BC-MI-179	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra. DM, IID e NFD. 10% de borda de tecido não neoplásico. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico.
BC-MI-181	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra. DM, IID e NFD. 10% de borda de tecido não neoplásico. Foi retirada por dissecação manual a borda de tecido não neoplásico.
BC-MI-186	Carcinoma ductal invasivo em 90% da amostra, DD, IID e NFA. 10% de tecido mamário não neoplásico e não separável.
BC-MI-198	Carcinoma ductal invasivo em 99% da amostra, DD, IID e NFA. 1% de tecido mamário não neoplásico e não separável.
BC-MI-276	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFD.
BC-MI-314	Carcinoma ductal invasivo em 100% da amostra, DM, IID e NFD.

Conforme mostra a **Tabela 1**, os tumores apresentavam subtipos luminais A e B (frequência de 36% e 64%, respectivamente), e predominantemente estadiamentos I e II (76%), grau nuclear 3 e grau histológico 1 e 2 (64%). O índice mitótico maior que 10 CGA ocorreu em maior frequência (83%) dentre os 23 tumores analisados, portanto 27 tumores não apresentaram essa informação. Majoritariamente, nossa casuística era composta por pacientes que fizeram uso de anticoncepcional por pelo menos 1 ano, tinham hábito de fumar e tiveram pelo menos uma gestação.

Quando as características clinicopatológicas dos tumores foram comparadas entre os grupos avaliados (AJ vs MI), não foi observada diferença estatística entre os subtipos luminais A e B ($P= 0,769$). Semelhantemente, não houve associação

significativa entre o índice mitótico, linfonodo comprometido, bem como o hábito de fumar e a ocorrência de gestação nos dois grupos. Por outro lado, as características mais agressivas tumores mediante ao TNM, grau nuclear, grau histológico e tamanho do tumor ocorrem em maior proporção no grupo AJ. O grau histológico e o tamanho do tumor foram significativamente associados com os tumores do grupo AJ ($P=0,047$ e $P<0,001$, respectivamente) (**Tabela 1**). Desta forma, sugerindo perfil agressivo desses tumores nos pacientes AJ.

Tabela 1 - Frequência das características clinicopatológicas dos tumores das pacientes dos grupos AJ e MI.

Dados	AJ (≤ 35 anos) n(%)	MI (50-65anos) n(%)	P valor
Subtipo			
Luminal A	8 (32)	10 (40)	0,769
Luminal B	17 (68)	15 (60)	
TNM			
I e II	16 (64)	22 (88)	0,095
III e IV	9 (36)	3 (12)	
Grau Nuclear			
1 e 2	5 (23)	11 (48)	0,073
3	17 (77)	12 (52)	
Grau Histológico			
1 e 2	13 (52)	15 (79)	0,047
3	12 (48)	4 (21)	
Linfonodo			
não comprometido	12 (75)	19 (79)	0,525
comprometido	4 (25)	5 (21)	
Tamanho			
menor que 2 cm	9 (39)	22 (88)	<0,001
maior que 2 cm	14 (61)	3 (12)	
Índice mitótico			
menor que 10 CGA	2 (20)	2 (15)	0,596
maior que 10 CGA	8 (80)	11 (85)	
Habito de fumar			
Nunca fumou	12 (86)	11 (61)	0,127
Fumou	2 (14)	7 (39)	
Uso de Anticoncepcional			
Não usou	4 (36)	8 (38)	0,617
Usou pelo menos 1 ano	7 (64)	13 (62)	
Gestação			
Nenhuma	8 (47)	8 (36)	0,364
Pelo menos 1	9 (53)	14 (64)	

LND não comprometido= linfonodo não comprometido e micrometastases sem extensão capsular; habito de fumar foi determinado para aquelas que fumaram pelo menos 1 ano; em negrito estão o valores de p significativo ($p \leq 0.05$).

Os heredogramas só estavam disponíveis para 12/27 pacientes do grupo AJ, e a partir da análise do BOADICEA 10 pacientes apresentaram baixo risco (< 15%) de serem portadores da mutação nos genes *BRCA1/2* (**Tabela 2**). Assim 2 pacientes (BC-AJ-173 e BC-AJ-206) apresentaram alto risco (> 15%) e foram excluídas do estudo. Dentre as pacientes sem informação do heredograma, 5 (BC-AJ-1004, BC-AJ-4011, BC-AJ-4015, BC-AJ-4019 e BC-AJ-4028) foram sequenciadas em um trabalho anterior do grupo, e não apresentaram mutação nos genes *BRCA1/2* (BASTOS et al. 2014). Resultando no total de 50 pacientes analisadas.

Tabela 2 - Probabilidade de risco das pacientes do grupo AJ apresentarem mutação nos genes *BRCA1/2*, baseado no teste BOADICEA (N=12).

Amostras	Probabilidade da mutação <i>BRCA1</i>	Probabilidade da mutação <i>BRCA2</i>	Probabilidade final de não apresentar mutação
BC-AJ-40	0.7%	6.5%	92,80%
BC-AJ-28	0.3%	2.7%	97%
BC-AJ-30	0.3%	1.2%	98.5%
BC-AJ-41	0.9%	3.4%	95.7%
BC-AJ-118	0.3%	1.6%	98%
BC-AJ-120	1%	15.6%	85.3%
BC-AJ-122	2.3%	4.9%	93%
*BC-AJ-173	1.6%	21.9%	76.6%
BC-AJ-176	0.6%	2.5%	97%
*BC-AJ-206	4.6%	39.3%	56%
BC-AJ-2036	0.5%	4.1%	95.4%
BC-AJ-4025	0.3%	0.9%	98.8%

*Alto risco de apresentar mutação nos genes *BRCA1/2* de acordo com o cálculo do banco de dados BOADICEA. A probabilidade final do risco de não apresentar mutação é dada pela subtração da probabilidade de mutação *BRCA 1e2* de 100%.

Para as mulheres do grupo MI a análise de risco para mutação em *BRCA1/2* não foi realizada, uma vez que rotineiramente, pacientes acima de 50 anos atendidas no A.C.Camargo Cancer Center não são encaminhadas para o departamento de Oncogenética, além disso, incluímos tumores ER positivo que são considerados com baixo risco de portar a mutação nos genes *BRCA1/2*. Essa conduta é adotada devido

aos achados na literatura que ressalta que a idade jovem, bem como a presença do tumor de subtipo triplo negativo, têm maiores chances de apresentar a mutação no gene *BRAC1* (CARRARO et al. 2013). Apenas 28% das mulheres acima de 50 anos de idade apresentam mutação no gene *BRCA2* (FORD et al. 1998).

4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MIRS DOS CARCINOMAS DE MAMA EM ADULTAS JOVENS

4.2.1 Qualidade e quantificação do miR

A quantificação e integridade do miR foram consideravelmente satisfatórias para as 50 amostras. Foi encontrada em 36 amostras avaliadas > 30 % de miRNA, as outras amostras apresentaram material insuficiente após a extração, nestes casos foi considerado a qualidade do RNA total da mesma amostra. Na **Figura 10** estão representadas a integridade dos miRNAs extraídos de cinco casos. A quantificação utilizando o NanoDrop mostrou um rendimento de miRNA de 470 ng à 7,34 ug considerando as 50 amostras.

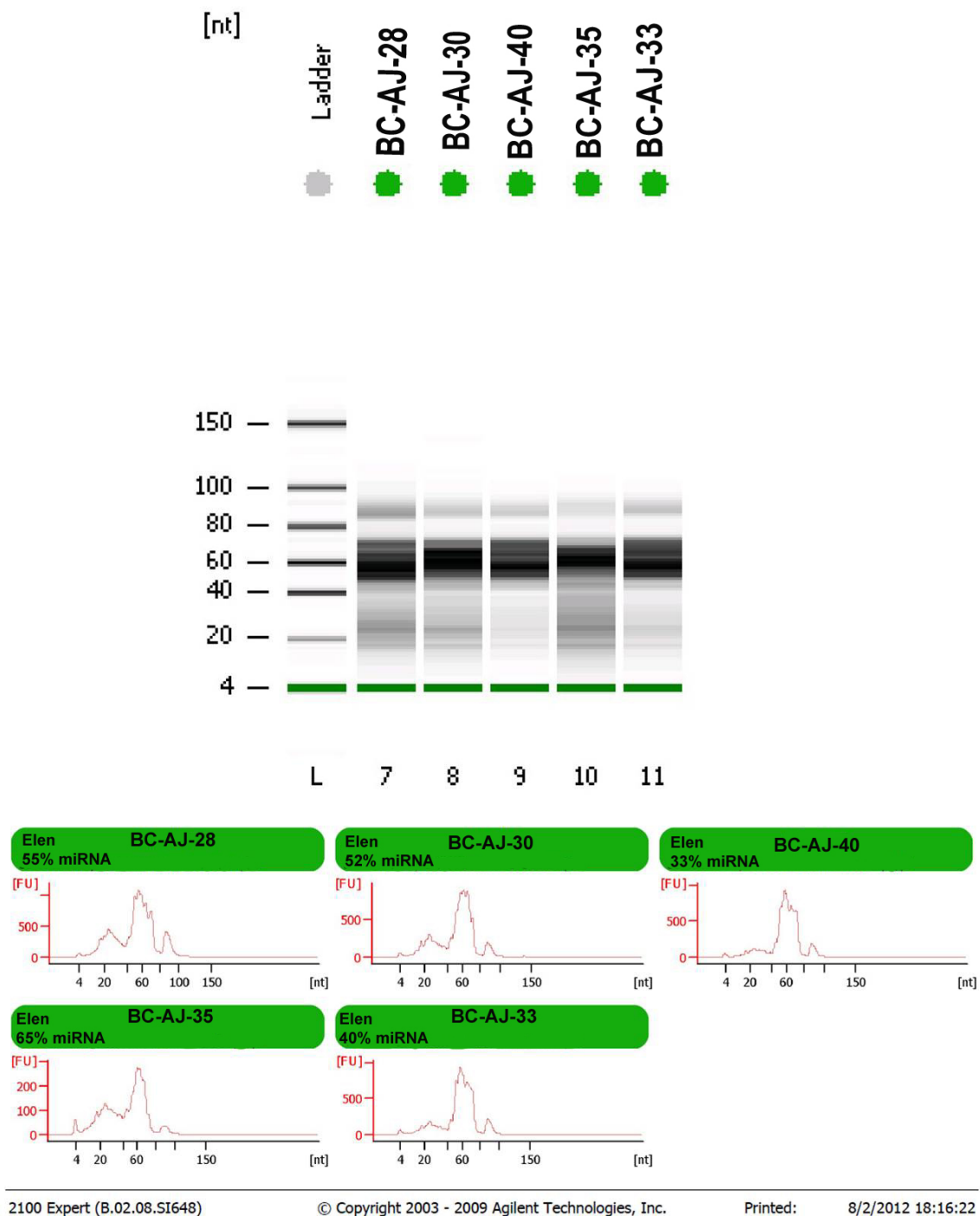


Figura 10 - Resultados da eletroforese mensurando a integridade do miR dado pelo equipamento Bioanalyzer usando o chip nano para pequenos RNAs.

O **Quadro 3** apresenta a quantificação e qualidade dos miRNAs extraídos dos tumores das pacientes dos grupos AJ e MI. Todas as amostras apresentaram material adequado para as análises de determinação do perfil de miR pelo sistema *TaqMan microRNA Assay* utilizando o método de qPCR.

Quadro 3 - Quantidade e qualidade do miR das amostras tumorais do grupo AJ (N=25) e MI (N=25).

Identificação	Quantidade (ug) (<i>NanoDrop</i>)	Qualidade (% de miRNA) (<i>Bioanalyzer</i>)
BC-AJ-28	2,59	55
BC-AJ-30	1,98	52
BC-AJ-33	2,18	40
BC-AJ-35	7,34	65
BC-AJ-40	1,46	33
BC-AJ-41	1,89	53
BC-AJ-118	1,7	65
BC-AJ-120	0,7	33
BC-AJ-122	3,1	40
BC-AJ-174	1,6	35
BC-AJ-175	2,4	52
BC-AJ-176	0,8	35
BC-AJ-195	2,7	55
BC-AJ-226	3,8	52
BC-AJ-1004	4,38	65
BC-AJ-2036	4,5	65
BC-AJ-4011	0,9	-
BC-AJ-4015	2,2	-
BC-AJ-4019	0,6	-
BC-AJ-4025	2,5	-
BC-AJ-4028	1,1	-
BC-AJ-329	1,4	-
BC-AJ-330	2,5	52
BC-AJ-334	4,3	52
BC-AJ-337	3,5	52
BC-MI-42T	4,2	65
BC-MI-43T	0,78	52
BC-MI-44T	0,88	40
BC-MI-45T	0,54	65
BC-MI-47T	1,3	33
BC-MI-48T	1,1	53
BC-MI-49T	2,9	40
BC-MI-50T	0,71	-

Cont/ Quadro 3

Identificação	Quantidade (ug) (NanoDrop)	Qualidade (% de miRNA) (Bioanalyzer)
BC-MI-52T	0,79	33
BC-MI-53T	0,9	52
BC-MI-54T	3,4	55
BC-MI-125T	1,2	40
BC-MI-126T	5,48	65
BC-MI-128T	0,6	-
BC-MI-129T	1,1	55
BC-MI-130T	0,8	-
BC-MI-133T	1,14	40
BC-MI-134T	2,59	52
BC-MI-178T	0,43	-
BC-MI-179T	0,53	-
BC-MI-181T	0,54	-
BC-MI-186T	1,2	40
BC-MI-198T	2,4	52
BC-MI-276T	1,4	33
BC-MI-314T	3,5	65

BC-AJ-* amostra de carcinoma de mama do grupo de pacientes adulto jovens. BC-MI-* amostra de carcinoma de mama do grupo de pacientes meia idade.

4.2.2 Expressão de miRs- qPCR

Foram excluídos das análises 68 miRs que apresentaram os valores de $C_T \geq 39$ (em mais de 60% das amostras) e assim, totalizamos 309 miRs analisados. A comparação entre os grupos AJ e MI resultou em 8 miRs diferencialmente expressos sendo os miR-9; miR-210; miR-33b, miR-18; miR-106a; miR-106b e o miR-518a-3p com maior expressão ($AJ > MI$) e o miR-372 com menor expressão ($AJ < MI$) com $\geq 90\%$ de confiança. A **Tabela 3** mostra as características dos 8 miRs, e informações segundo o *miRBase* (2014).

Tabela 3 - MiRs diferencialmente expressos na comparação entre os tumores (AJ vs MI).

miR	Afirmação	Confiança	Identidade da empresa	Sequencia do miR	Região genômica	Posição genômica
hsa-miR-9↑	AJ > MI	0,99	000583	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	intergênico	1q22
hsa-miR-106a↑	AJ > MI	0,97	002169	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	intergênico	Xq26
hsa-miR-106b↑	AJ > MI	0,94	000442	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	intragênico	7q22
hsa-miR-18b↑	AJ > MI	0,94	001009	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUA	intergênico	Xq26
hsa-miR-210↑	AJ > MI	0,93	000512	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	intergênico	11p15
hsa-miR-33b↑	AJ > MI	0,93	001565	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGCA	intragênico	17p11
hsa-miR-518a-3p↑	AJ > MI	0,93	002397	GAAAGCGCUUCCCUUUGCUGGA	intergênico	19q13
hsa-miR-372↓	AJ < MI	0,93	000560	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU	intergênico	19q13

MiRs em cor: azul (maior expressão), vermelho (menor expressão) nos tumores do grupo AJ

4.2.3 Associação da expressão de miRs e dados clínicopatológicos

A alta expressão do miR-9 e do miR-33b apresentou associação estatisticamente significativa ($P=0,038$ e $P=0,016$, respectivamente) com o tamanho maior do tumor (≥ 2 cm). Além disso, foi observado uma associação estatisticamente significativa entre a maior expressão do miR-9 ($P < 0,001$) e o estadiamento avançado (TNM III e IV). Os baixos níveis de expressão dos miR-106b e miR-518a-3p foram observados em tumores com estadiamento menos avançado (TNM I e II), demonstrando uma associação estatisticamente significativa nestes casos ($P=0,02$ e $P=0,002$, respectivamente). O alto nível de expressão do miR-210 e a baixa expressão do miR-372 foram significativamente associados com os tumores de tamanho maior (≥ 2 cm) ($P=0,015$ e $P=0,001$, respectivamente). Por outro lado, não houve associação significativa entre os miRs, o grau nuclear e histológico (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Associação entre os miRs e as características clínicas do tumor.

miR	Grau nuclear			Grau histológico			Tamanho do tumor			TNM			Ki67		
	1 e 2	3	P	1 e 2	3	P	< 2 cm	≥ 2 cm	P	I e II	III e IV	P	negativo	positivo	P
miR-9															
Negativo	11(44%)	14 (56%)	0,22	15 (68%)	7 (32%)	0,76	21 (78%)	6 (22%)	0,038	26 (96%)	1 (4%)	< 0,001	9 (37%)	15 (63%)	0,35
Positivo	5 (25%)	15 (75%)		13 (59%)	9 (41%)		10 (48%)	11 (52%)		12 (52%)	11 (48%)		5 (24%)	16 (76%)	
miR-18b															
Negativo	9 (39%)	14 (61%)	0,76	12 (60%)	8 (40%)	0,76	18 (78%)	5 (22%)	0,075	19 (79%)	5 (21%)	0,75	7 (29%)	17 (71%)	1
Positivo	7 (32%)	15 (68%)		16 (68%)	8 (33%)		13 (52%)	12 (48%)		19 (73%)	7 (27%)		7 (33%)	14 (67%)	
miR-33b															
Negativo	9 (36%)	16 (64%)	1	15 (71%)	8 (35%)	1	21 (81%)	5 (19%)	0,016	23 (85%)	4 (15%)	0,18	7 (29%)	17 (71%)	1
Positivo	7 (35%)	13 (65%)		13 (62%)	8 (38%)		10 (46%)	12 (55%)		15 (65%)	8 (35%)		7 (33%)	14 (67%)	
miR-106a															
Negativo	10 (46%)	12 (55%)	0,22	13 (65%)	7 (35%)	1	19 (76%)	6 (24%)	0,13	20 (80%)	5 (20%)	0,74	8 (33%)	16 (67%)	0,75
Positivo	6 (26%)	17 (74%)		15 (63%)	9 (38%)		12 (52%)	11 (48%)		18 (72%)	7 (28%)		6 (29%)	15 (71%)	
miR-106b															
Negativo	8 (38%)	13 (62%)	0,77	12 (67%)	6 (33%)	0,76	16 (73%)	6 (27%)	0,37	21 (91%)	2 (9%)	0,02	7 (29%)	17 (71%)	1
Positivo	8 (33%)	16 (67%)		16 (62%)	10 (39%)		15 (58%)	11 (42%)		17 (63%)	10 (37%)		7 (33%)	14 (67%)	
miR-210															
Negativo	8 (38%)	13 (62%)	0,77	12 (63%)	7 (37%)	1	20 (83%)	4 (17%)	0,015	19 (79%)	5 (21%)	0,75	8 (33%)	16 (67%)	0,79
Positivo	8 (33%)	16 (68%)		16 (64%)	9 (36%)		11 (46%)	13 (54%)		19 (73%)	7 (27%)		6 (29%)	15 (71%)	
miR-372															
Negativo	7 (35%)	13 (65%)	1	12 (57%)	9 (43%)	0,53	8 (38%)	13 (62%)	0,001	15 (65%)	8 (35%)	0,18	4 (19%)	17 (81%)	0,12
Positivo	9 (36%)	16 (64%)		16 (70%)	7 (30%)		23 (85%)	4 (15%)		23 (85%)	4 (15%)		10 (42%)	14 (58%)	
miR-518a-3p															
Negativo	9 (41%)	13 (59%)	0,54	14 (67%)	7 (33%)	0,76	15 (65%)	8 (35%)	1	23 (96%)	1 (4%)	0,002	9 (36%)	16 (64%)	0,52
Positivo	7 (30%)	16 (70%)		14 (61%)	9 (39%)		16 (64%)	9 (36%)		15 (58%)	11 (42%)		5 (25%)	15 (75%)	

4.2.4 Predição dos gene-alvos *in silico*

Após identificar os 8 miRs diferencialmente expressos o banco de dados miRWalk foi utilizado para determinar os mRNA-alvos preditos, de acordo com os parâmetros do microT-CDs cujos os critérios foram: (a) complementariedade perfeita da região 5' “seed” 6-8nt (nucleotídios) do miRNA com a sequência da região 3' do RNA mensageiro; (b) sequência do alvo conservada entre espécies; (c) forte estabilidade termodinâmica do miRNA-RNA *duplex* (ligação entre as duas moléculas); (d) comparação entre múltiplos sítios por proximidade; (e) existência da região não-pareada na porção central da ligação miRNA-RNA *duplex* (*loop*). Foram preditos de 972 a 11711 mRNA-alvos (considerando o gene e suas variantes) para cada miRs sendo que o miR-9 obteve o maior número de mRNA-alvos preditos (**Figura 11**). Muitos desses gene-alvos foram preditos para mais de um dos nossos 8 miRs. A análise de predição resultou em uma lista de 38974 gene-alvos (considerando as variantes e repetição da interação miR:mRNA-alvos preditos).

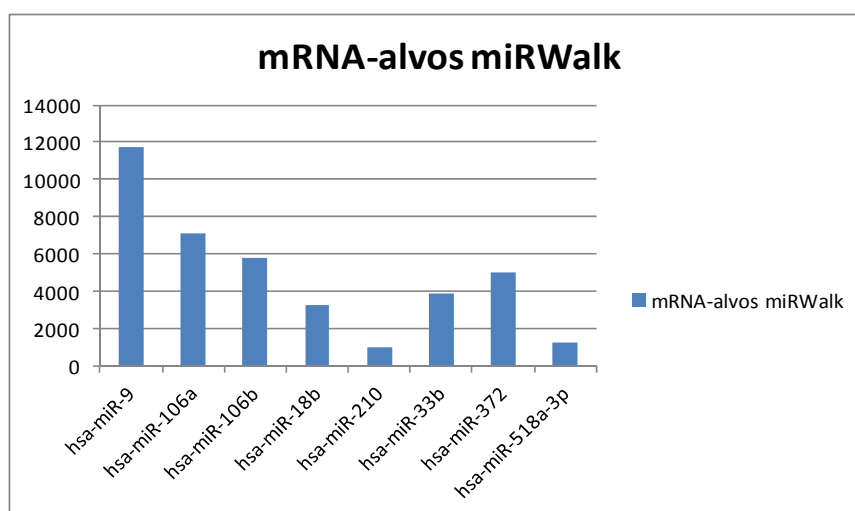


Figura 11 - Gráfico de barras representando o número de mRNA-alvos preditos e seus respectivos miRs diferencialmente expressos entre os tumores do grupo AJ e MI.

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICO DOS CARCINOMAS DE MAMA EM ADULTAS JOVENS

4.3.1 Quantidade e qualidade do RNA total do tecido fresco congelado

A área selecionada (marcada de caneta vermelha) continha células epiteliais tumorais (> 70%) e pelo menos 30% de estroma (**Figura 12**). O RNA total atingiu a quantidade e qualidade satisfatórias descritas na **Tabela 5**. O material foi submetido a amplificação (aRNA) e marcação, a atividade específica e rendimento do procedimento foram calculados e consideramos satisfatórios os valores ≥ 6 e $\geq 0,825$, respectivamente.

Tabela 5 - Qualidade e quantidade do RNA total extraído, amplificado e marcado a partir do tecido tumoral congelado.

Amostra	Extração RNA total		aRNA (2ºRound) - marcado				Cálculo	
	ng/uL	260/280	ng/uL	260/280	Cy3 (referencia)	Cy5 (amostra)	Atividade especifica	Rendimento
BC-AJ-28	23	1,63	166,1	2,43	-	2,2	13	3,32
BC-AJ-30	31,9	1,87	414,7	2,39	-	6,4	15	8,29
BC-AJ-35	72,5	2	544,1	2,27	-	6,5	12	10,88
BC-AJ-40	16,5	1,69	224	2,55	-	1,8	8	4,48
BC-AJ-41	10,6	1,94	80,2	2,41	-	0,7	9	1,60
BC-AJ-118	22,8	1,88	351,7	2,39	-	3,3	9	7,03
BC-AJ-174	18,6	1,84	427,1	2,26	-	8,3	19	8,54
BC-AJ-175	34,5	1,92	449,6	2,25	-	7,6	17	8,99
BC-AJ-176	95,6	2,02	531	2,08	-	7,9	15	10,62
BC-AJ-329	55,7	1,97	711,8	2,33	-	10	15	14,24
BC-AJ-1004	34,5	1,82	326,1	2,41	-	3,3	10	6,52
BC-AJ-2036	25,8	1,75	204,1	2,35	-	2,2	11	4,08
BC-AJ-4011	51,3	1,92	435,3	2,22	-	5	11	8,71
BC-AJ-4015	34,4	1,86	451	2,3	-	2,9	6	9,02
BC-AJ-4019	75,6	1,96	581,3	2,01	-	3,9	7	11,63
BC-AJ-4028	50,5	1,86	432,5	2,25	-	6,1	14	8,65
BC-MI-42	17,3	1,75	439,3	2,33	-	8,5	19	8,79
BC-MI-43	26,1	1,74	638,8	1,93	-	7,9	12	12,78
BC- MI -47	23,6	1,79	498,9	2,18	-	6,6	13	9,98
BC- MI -48	36,8	2	592,1	2,07	-	4,7	8	11,84
BC- MI -49	50	1,96	656,5	2,11	-	4,6	7	13,13
BC- MI -50	27,6	1,76	123,4	2,33	-	0,8	6	2,47
BC- MI -52	19,6	1,72	442,5	2,35	-	8,4	19	8,85
BC- MI -53	53	1,9	459,2	2,27	-	3,6	8	9,18
BC- MI -126	26	1,74	339,3	2,38	-	3,1	9	6,79
BC- MI -128	34,6	1,81	400,5	2,45	-	4,1	10	8,01
BC- MI -178	27,4	1,98	412,5	2,49	-	6,1	15	8,25
BC- MI -130	24,8	1,85	528,8	2,19	-	5,1	10	10,58
BC- MI -133	22,6	1,87	433,5	2,29	-	3,6	8	8,67
Referencia universal	100	2,2	415,8	2,28	7,8	-	19	8,32

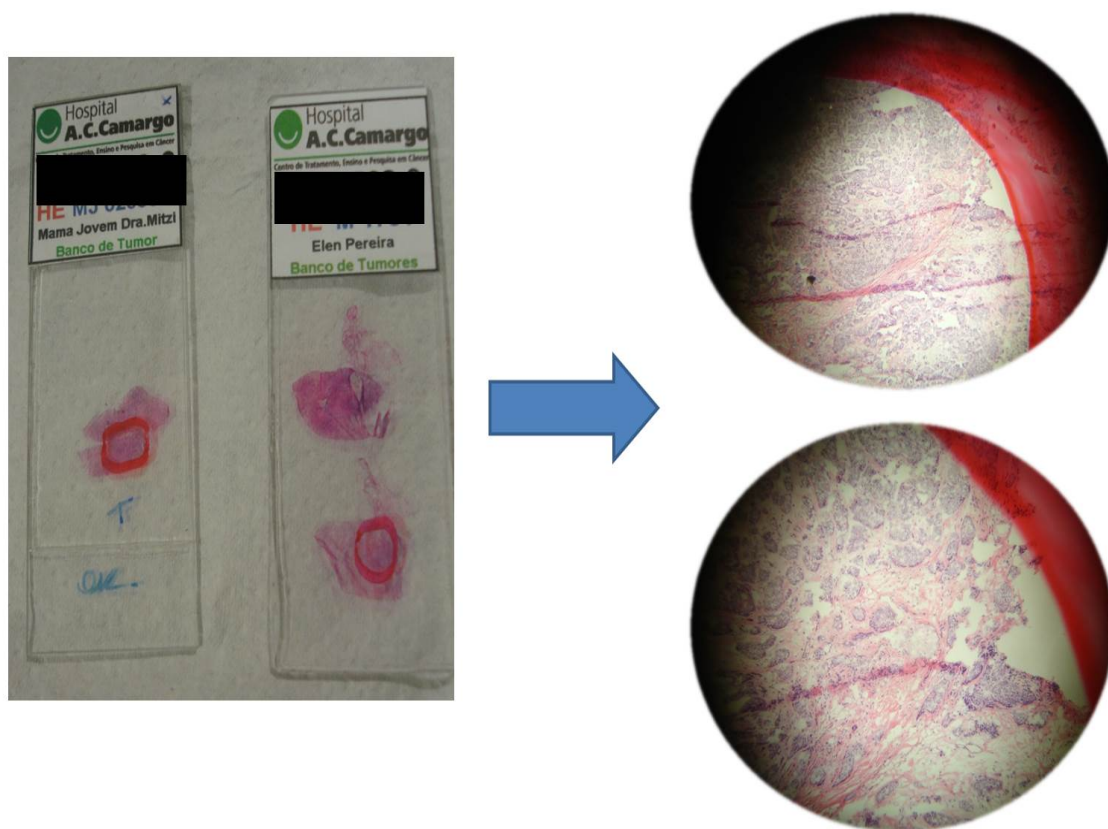


Figura 12 - Fotos das lâminas marcadas por hematoxilina-eosina (HE), e em grande aumento por microscópio óptico. A marcação com caneta vermelha mostra a área onde foi feito o esfregaço com a ponteira para a extração do RNA total para o ensaio de *microarray*.

4.3.2 Determinação dos mRNA-alvos

Os ensaios de *microarray* foram realizados com as amostras disponíveis, sendo 16 tumores das pacientes do grupo AJ e 13 tumores das pacientes do grupo MI. A análise inicial foi realizada com o ensaio utilizando o RNA do tumor total (não microdissecados por *LCM*). Após a normalização obtivemos 18.098 probes (genes e suas variantes), e a partir disso, obtivemos 1306 genes diferencialmente expressos com 80% ou mais de confiança. Dentre esses, 789 genes apresentaram menor expressão e 517 genes apresentaram aumento de expressão nos tumores do grupo AJ

em relação ao grupo MI. Uma vez que nosso objetivo foi analisar genes que possam ser regulados por miR, buscamos na lista dos genes diferencialmente expressos no experimento de *microarray* os presentes na lista de gene-alvos preditos e encontramos 602 gene-alvos (ou miR:mRNA-alvos) possivelmente regulados por pelo menos 1 dos nossos 8 miRs (**Tabela do Anexo 2**). Desse grupo de miR:mRNA-alvos, 440 genes seguiram a regulação clássica do miR, que consiste na relação inversa entre a expressão do miR e do mRNA-alvo, ou seja, a super expressão do miR resultará na baixa expressão do gene-alvo, e vice-versa, e denominamos esse grupo em gene-alvos diretos (miR:mRNA-alvo direto). Destes 440 gene-alvos diretos, 363 apresentaram menor expressão enquanto os miRs correspondentes apresentaram maior expressão, e 77 gene-alvos apresentaram maior expressão enquanto que os respectivos miRs apresentaram menor expressão nos tumores do grupo AJ. Os 162 gene-alvos restantes, apesar de serem alvos preditos dos miRs, não apresentaram expressão inversa ao miR, sugerindo algum outro mecanismo de regulação (**Figura 13**).

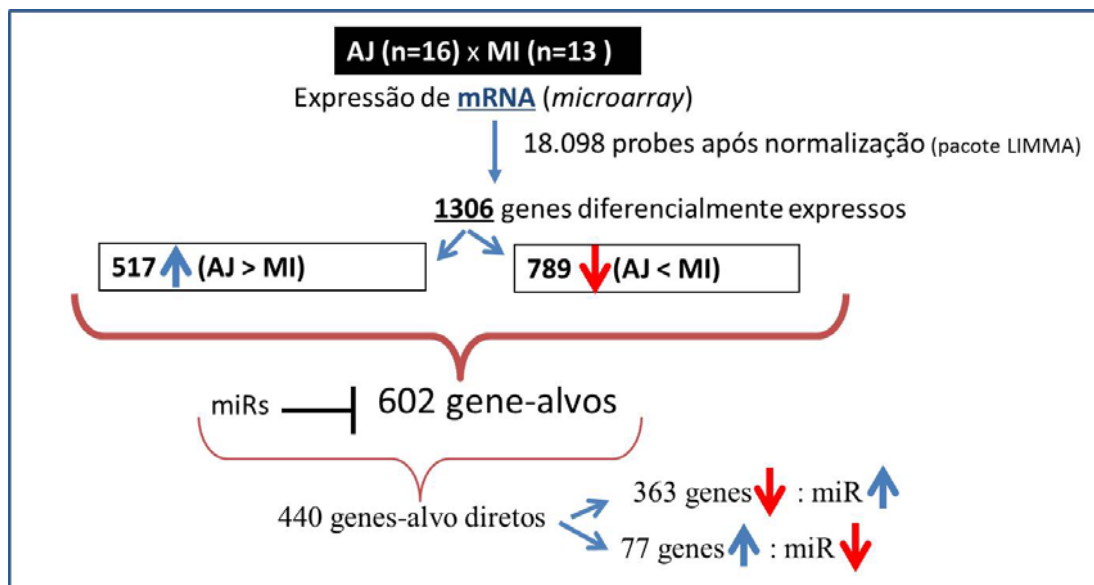


Figura 13 - Fluxograma dos resultados dos mRNA-alvos diferencialmente expressos. Obtivemos 1306 genes, sendo 789 genes com menor expressão e 517 com aumento de expressão nos tumores do grupo AJ. Foram observados 602 gene-alvos possivelmente regulados por pelo menos 1 dos nossos 8 miRs, desses, destes 440 gene-alvos diretos, 363 apresentaram menor expressão enquanto os miRs correspondentes apresentaram maior expressão, e 77 gene-alvos apresentaram maior expressão enquanto que os respectivos miRs apresentaram menor expressão nos tumores do grupo AJ em comparação com o grupo MI.

4.3.3 Vias biológicas do mRNA-alvo

O banco de dados *Web-based Gene Set Analysis Toolkit* (Webgestalt) foi utilizado para determinar vias biológicas importantes relacionadas aos 602 gene-alvos e sete vias biológicas foram enriquecidas: 1) sinalização da MAPK; 2) sinalização da neurotrofina; 3) metabólica; 4) do câncer; 5) apoptose; 6) sinalização da WNT; 7) meiose da oocitose (**Quadro 4**). Essas vias incluem os seguintes processos biológicos: proliferação, ciclo celular, apoptose, desenvolvimento e metabolismo. A **Figura 14** exemplifica uma das vias envolvidas com os mRNA-alvos, como a via de sinalização da MAPK e os possíveis miRs envolvidos. Estes resultados sugerem que os 602 gene-alvos do miR representam vias enriquecidas que

possam estar favorecendo a carcinogênese nos tumores das pacientes com idade ≤ 35 anos. Um fluxograma foi montado para melhor compreensão dos resultados dos miRs e mRNA obtidos neste estudo (**Figura 15**).

Quadro 4 - Gene-alvos relacionados às vias biológicas (Webstalt) regulados diretamente ou indiretamente por pelo menos um miRs

<i>Gene Symbol</i>	Nome do gene	Afirmação gene	pelo menos 1 miR
Via de sinalização da MAPK (C=268; O=13; E=3.44; R=3.78; rawP=4.99e-05; adjP=0.0023); 14 mRNA			
FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	AJ > MI	hsa-miR-33b
GNA12	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12	AJ > MI	hsa-miR-18b
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	AJ > MI	hsa-miR-372
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	AJ < MI	hsa-miR-210
DUSP8	dual specificity phosphatase 8	AJ > MI	hsa-miR-372
PLA2G2D	phospholipase A2, group IID	AJ > MI	hsa-miR-9
DUSP3	dual specificity phosphatase 3	AJ > MI	hsa-miR-372
RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	AJ < MI	hsa-miR-106b
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	AJ > MI	hsa-miR-18b
MKNK2	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	AJ < MI	hsa-miR-9
PPM1A	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1A	AJ > MI	hsa-miR-106a
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic subunit of PKA, alpha	AJ > MI	hsa-miR-9
MAPT	microtubule-associated protein tau	AJ < MI	hsa-miR-372
PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	AJ < MI	hsa-miR-106b
Via de sinalização da Neurotrofina (C=127; O=8; E=1.63; R=4.91; rawP=0.0002; adjP=0.0030); 8 mRNA			
ABL1	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	AJ > MI	hsa-miR-210
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	AJ < MI	hsa-miR-210
SHC4	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4	AJ > MI	hsa-miR-372
RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	AJ < MI	hsa-miR-106b
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	AJ < MI	hsa-miR-372
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	AJ > MI	hsa-miR-372
FOXO3	forkhead box O3	AJ > MI	hsa-miR-9
CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	AJ < MI	hsa-miR-33b

Cont/ Quadro 4

Via Metabolica (C=1130; O=30; E=14.49; R=2.07; rawP=0.0002; adjP=0.0033); 30 mRNA			
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p
CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11	AJ > MI	hsa-miR-33b
GALNTL5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-like 5	AJ < MI	hsa-miR-33b
DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	AJ < MI	hsa-miR-106b
PRIM2	primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)	AJ < MI	hsa-miR-18b
MUT	methylmalonyl CoA mutase	AJ < MI	hsa-miR-9
SDHC	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein 15kDa	AJ > MI	hsa-miR-106a
PCYT1B	phosphate cytidyltransferase 1, choline, beta	AJ < MI	hsa-miR-372
PIGK	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K	AJ < MI	hsa-miR-9
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	AJ < MI	hsa-miR-33b
OLAH	oleoyl-ACP hydrolase	AJ < MI	hsa-miR-372
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	AJ > MI	hsa-miR-9
PIGL	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L	AJ < MI	hsa-miR-9
PIP5K1C	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma	AJ < MI	hsa-miR-18b
LDHAL6B	lactate dehydrogenase A-like 6B	AJ < MI	hsa-miR-372
DPM2	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit	AJ > MI	hsa-miR-9
GAD2	glutamate decarboxylase 2 (pancreatic islets and brain, 65kDa)	AJ < MI	hsa-miR-9
PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A	AJ > MI	hsa-miR-106a
MGAT1	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	AJ > MI	hsa-miR-9
PLA2G2D	phospholipase A2, group IID	AJ > MI	hsa-miR-9
ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	AJ > MI	hsa-miR-33b
MECR	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase	AJ < MI	hsa-miR-372
HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	AJ < MI	hsa-miR-106b
COMT	catechol-O-methyltransferase	AJ > MI	hsa-miR-33b
AHCY	Adenosylhomocysteinase	AJ > MI	hsa-miR-106a
AHCYL1	adenosylhomocysteinase-like 1	AJ > MI	hsa-miR-372
DGUOK	deoxyguanosine kinase	AJ < MI	hsa-miR-18b
NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10, 42kDa	AJ > MI	hsa-miR-33b
PIGS	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	AJ > MI	hsa-miR-372
ATP6V1G1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1	AJ < MI	hsa-miR-106a

Cont/ Quadro 4

Via do Câncer (C=326; O=13; E=4.18; R=3.11; rawP=0.0003; adjP=0.0033); 13 mRNA			
ABL1	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	AJ > MI	hsa-miR-210
ERS1	estrogen receptor	AJ < MI	hsa-miR-18b
FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	AJ > MI	hsa-miR-33b
SMAD3	SMAD family member 3	AJ < MI	hsa-miR-9
RXRG	retinoid X receptor, gamma	AJ < MI	hsa-miR-372
TPM3	tropomyosin 3	AJ > MI	hsa-miR-9
DCC	deleted in colorectal carcinoma	AJ < MI	hsa-miR-9
RET	ret proto-oncogene	AJ < MI	hsa-miR-9
LAMC3	laminin, gamma 3	AJ > MI	hsa-miR-9
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	AJ > MI	hsa-miR-9
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	AJ > MI	hsa-miR-9
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	AJ > MI	hsa-miR-372
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	AJ > MI	hsa-miR-372
LAMC2	laminin, gamma 2	AJ > MI	hsa-miR-9
Via da Apoptose (C=87; O=5; E=1.12; R=4.48; rawP=0.0053; adjP=0.0202); 5 mRNA			
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	AJ > MI	hsa-miR-372
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	AJ < MI	hsa-miR-372
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	AJ > MI	hsa-miR-9
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	AJ < MI	hsa-miR-372
PRKAR1B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	AJ < MI	hsa-miR-106a
Via de sinalização da Wnt (C=150; O=7; E=1.92; R=3.64; rawP=0.0033; adjP=0.0136); 7 mRNA			
SMAD3	SMAD family member 3	AJ < MI	hsa-miR-9
DKK2	dickkopf 2 homolog (Xenopus laevis)	AJ > MI	hsa-miR-9
PPP2R5C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma	AJ > MI	hsa-miR-106a
WIF1	WNT inhibitory factor 1	AJ > MI	hsa-miR-33b
CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	AJ > MI	hsa-miR-9
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	AJ > MI	hsa-miR-9
CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	AJ < MI	hsa-miR-33b
Via da meiose Oocitose (C=112; O=7; E=1.44; R=4.87; rawP=0.0006; adjP=0.0044); 7 mRNA			
PPP2R5C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma	AJ > MI	hsa-miR-106a
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	AJ > MI	hsa-miR-372
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	AJ > MI	hsa-miR-9
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	AJ > MI	hsa-miR-372
RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	AJ < MI	hsa-miR-106b
CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	AJ < MI	hsa-miR-33b
ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1	AJ < MI	hsa-miR-106a

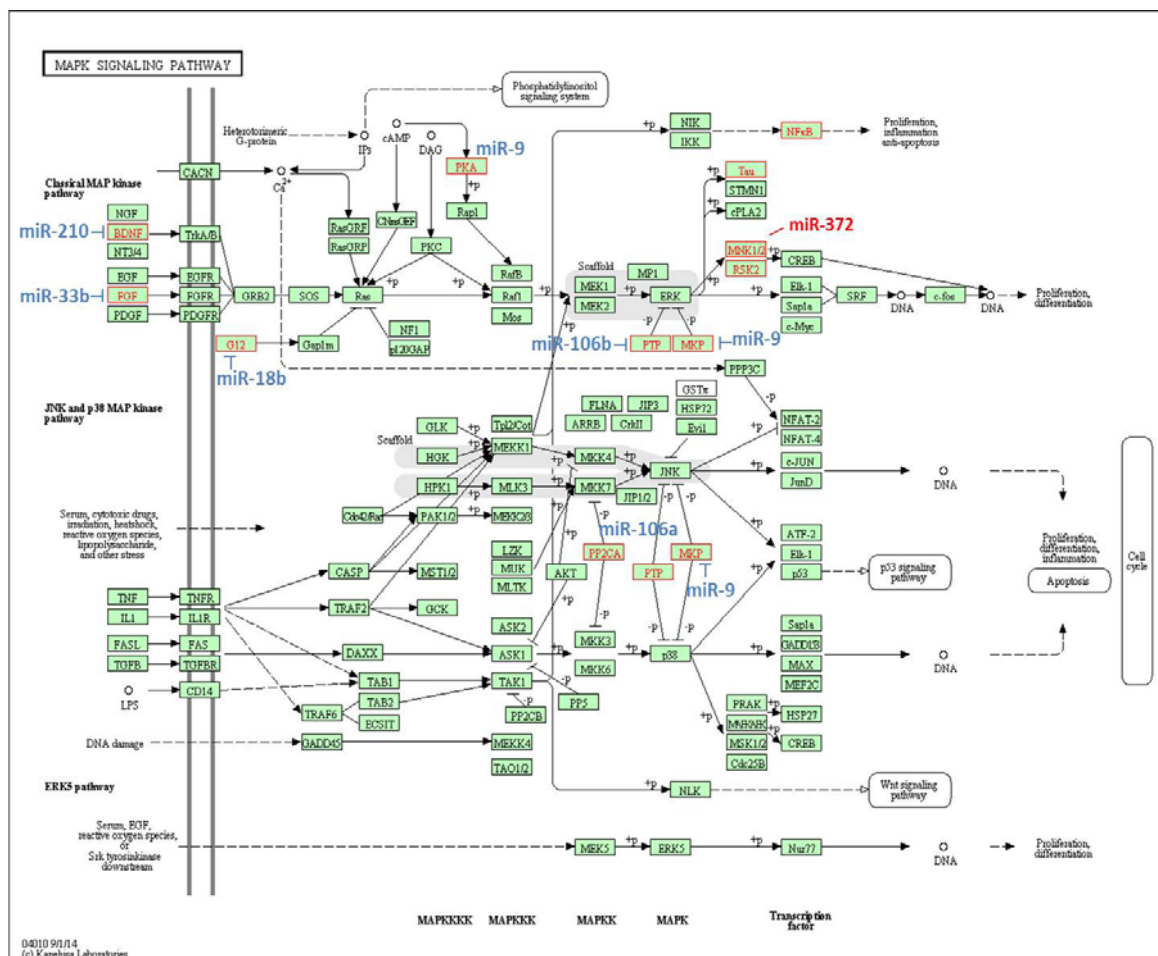


Figura 14 - Via de sinalização da MAPK enriquecida baseada nos gene-alvos diretos ou indiretos dos miRs. Os miRs que regulam diretamente os genes foi simulado na figura. A baixa expressão dos genes *BDNF*, *MKNK2*, *PTPRF*, *RPS6KA1* e *MAPT* podem ser decorrentes da regulação direta ou indireta dos sete miRs que apresentou super expressão nos tumores do grupo AJ quando comparados com o grupo MI. Os gene-alvos *FGF1*, *GNA12*, *DUSP2*, *DUSP8*, *PLA2G2D*, *DUSP3*, *RELB*, *PPM1A* e *PRKACA* podem estar com maior expressão decorrente da baixa regulação do miR- 372 que por sua vez apresentou menor expressão nos tumores do grupo AJ.

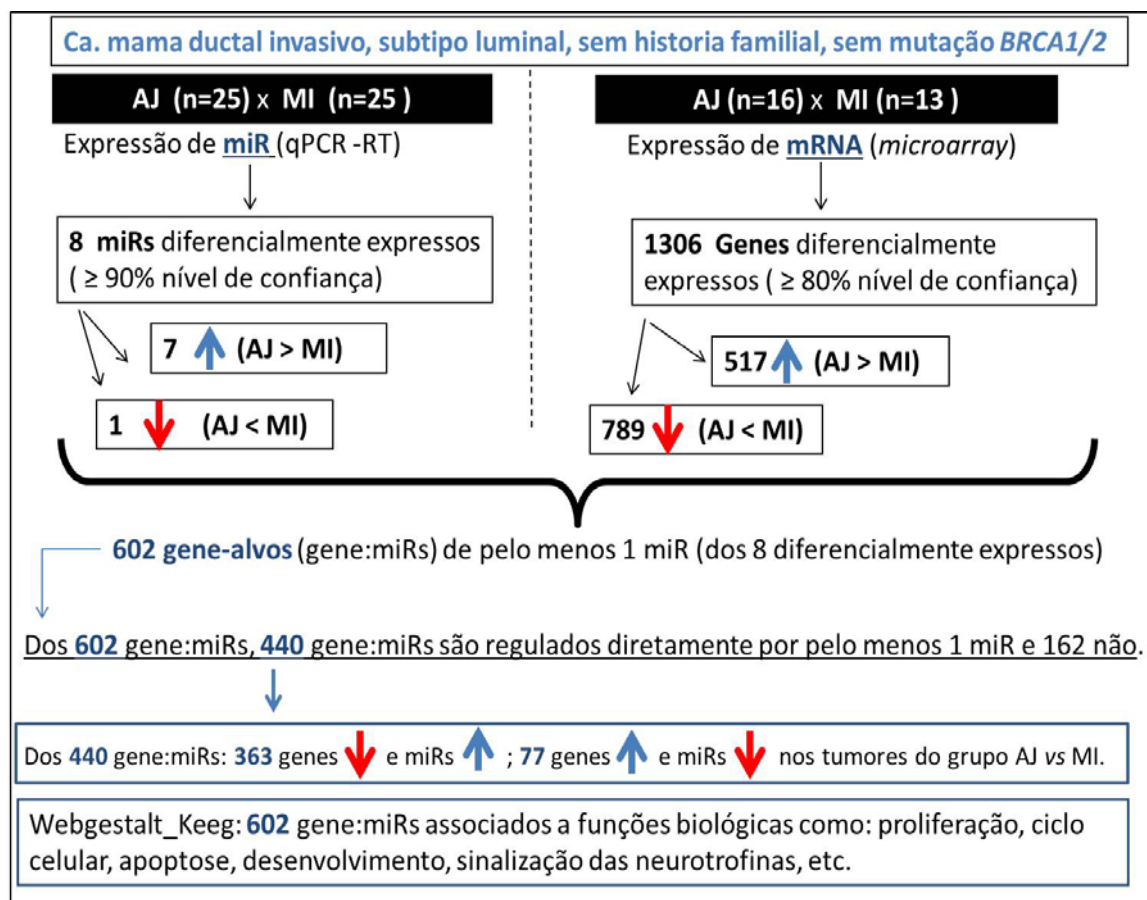


Figura 15 - Fluxograma representando os resultados dos miRs e mRNAs. Setas em negrito representam maior expressão (azul) e menor expressão (vermelho) nos tumores do grupo AJ. A integração dos dados de miR e mRNA resultaram em 602 gene-alvos diferencialmente expressos, regulados direto ou indiretamente por pelo menos 1 dos 8 miRs. As funções biológicas relacionadas aos 602 gene-alvos direto/indireto foram: proliferação, ciclo celular, apoptose, desenvolvimento e metabolismo.

4.3.4 Análise de classificação das amostras pela expressão dos mRNA-alvos

A análise de classificação das amostras foi realizada utilizando a combinação de 8 gene-alvos diretos (*ESR1*, *RPS6KA1*, *YWHAZ*, *BCL7*, *PARP12*, *DUSP2*, *DUSP8* e *PIGS*), sendo 4 miR:mRNA-alvos com maior expressão e 4 miR:mRNA-alvos com menor expressão nos tumores do grupo AJ e tumores do grupo MI (**Figura 16**). O valor de corte da classificação foi 0,32, portanto adotamos que as amostras com o

valor $\geq 0,32$ foram classificadas como do grupo AJ, e o valor $< 0,32$ foram classificadas como MI. No gráfico de classificação esta combinação dos 8 miR:mRNA-alvos diretos foram capazes de classificar os grupos de pacientes corretamente com acurácia de 88% para os tumores do grupo AJ e 85% para os tumores do grupo MI (**Figura 16**), mostrando que esta combinação de 8 genes foram capazes de separar os dois grupos.

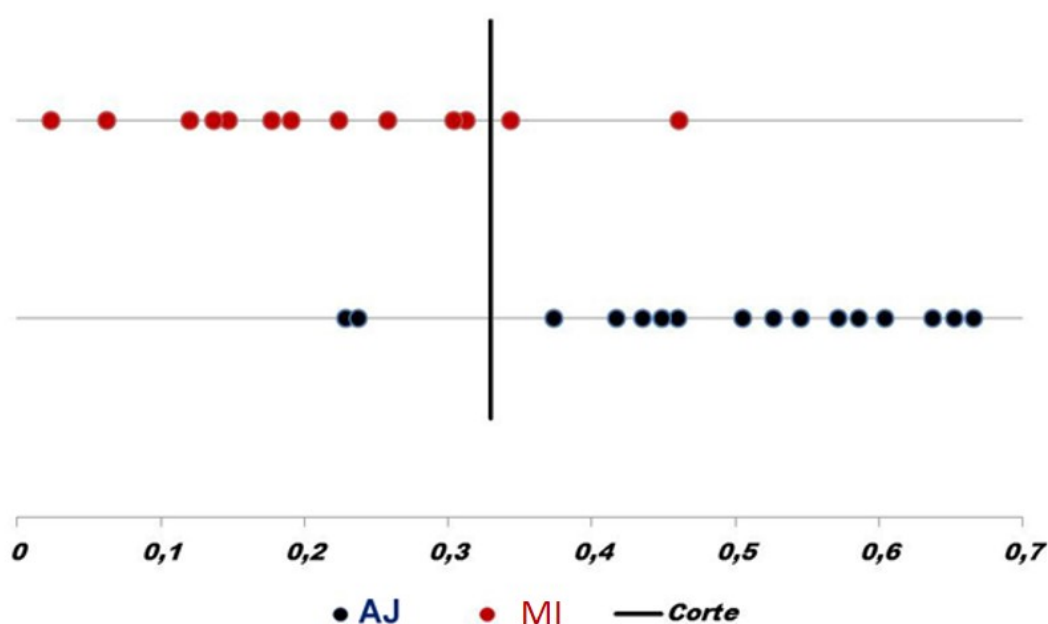


Figura 16 - Análise de classificação utilizando a combinação dos 8 gene-alvos diretamente regulados por pelo menos um miR. Bolas representam as amostras tumorais do grupo AJ (azul) e do grupo MI (vermelho).

4.3.5 Associação da expressão de genes e dados clinicopatológicos

As pacientes com tumores de grau nuclear 3 tiveram uma associação estatisticamente significativa ($P = 0,003$) com os 45% dos tumores que apresentaram um baixo nível de expressão do gene *BCL7*. O baixo nível de expressão do gene

PARP12 foi estatisticamente associado ($P = 0,03$) com a positividade dos linfonodos. Foi observado uma associação entre os baixos níveis de expressão dos genes *ESR1*, *PARP12*, *RPS6KA*, bem como o alto nível de expressão do gene *DUSP8* e o alto grau nuclear (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Associação da expressão de genes e características clinicopatológicas

Gene	Grau nuclear			Grau histológico			Tamanho do tumor			TNM			Linfonodo		
	1 e 2	3	P	1 e 2	3	P	< 2 cm	≥ 2 cm	P	I e II	III e IV	P	negativo	positivo	P
<i>BCL7</i>↓															
Negativo	6(54%)	5 (46%)	0,003*	9 (75%)	3 (25%)	0,13	10 (67%)	5 (33%)	0,46	11 (73%)	4 (27%)	1	7 (64%)	4 (36%)	1
Positivo	0 (0%)	14 (100%)		6 (43%)	8 (57%)		7 (50%)	7 (50%)		11 (79%)	3 (21%)		9 (69%)	4 (31%)	
<i>ESR1</i>↓															
Negativo	1 (9%)	10 (91%)	0,18	6 (50%)	6 (50%)	0,69	7 (58%)	5 (42%)	1	7 (58%)	5 (42%)	0,09	6 (60%)	4 (40%)	0,67
Positivo	5 (36%)	9 (64%)		9 (64%)	5 (36%)		10 (59%)	7 (41%)		15 (88%)	2 (12%)		10 (71%)	4 (29%)	
<i>YWHAZ</i>↑															
Negativo	8 (57%)	6 (43%)	1	8 (57%)	6 (43%)	1	8 (53%)	7 (47%)	0,71	10 (67%)	5 (33%)	0,39	10 (77%)	3 (23%)	0,39
Positivo	7 (58%)	5 (42%)		7 (58%)	5 (42%)		9 (64%)	5 (36%)		12 (86%)	2 (14%)		6 (54%)	5 (46%)	
<i>DUSP8</i>↑															
Negativo	2 (20%)	8 (80%)	1	7 (58%)	5 (42%)	1	7 (58%)	5 (42%)	1	7 (58%)	5 (42%)	0,09	5 (62%)	3 (38%)	1
Positivo	4 (27%)	11 (73%)		8 (57%)	6 (43%)		10 (59%)	7 (41%)		15 (88%)	2 (12%)		11 (69%)	5 (31%)	
<i>PIGS</i>↑															
Negativo	3 (23%)	10 (77%)	1	5 (38%)	8 (62%)	0,11	7 (50%)	7 (50%)	0,46	10 (71%)	4 (27%)	0,68	8 (67%)	4 (33%)	1
Positivo	3 (25%)	9 (75%)		10 (77%)	3 (23%)		10 (67%)	5 (33%)		12 (80%)	3 (20%)		8 (67%)	4 (33%)	
<i>PARP12</i>↓															
Negativo	3 (25%)	9 (75%)	1	7 (54%)	6 (46%)	1	9 (69%)	4 (31%)	0,45	9 (69%)	4 (31%)	0,67	4 (40%)	6 (60%)	0,03*
Positivo	3 (23%)	10 (77%)		8 (61%)	5 (39%)		8 (50%)	8 (50%)		13 (81%)	3 (19%)		12 (86%)	2 (14%)	
<i>DUSP2</i>↑															
Negativo	4 (27%)	11 (73%)	1	9 (56%)	7 (44%)	1	12 (63%)	7 (37%)	0,69	16 (84%)	3 (16%)	0,19	10 (67%)	5 (33%)	1
Positivo	2 (20%)	8 (80%)		6 (60%)	4 (40%)		5 (50%)	5 (50%)		6 (60%)	4 (40%)		6 (67%)	3 (33%)	
<i>RPS6KA1</i>↓															
Negativo	2 (18%)	9 (82%)	0,66	7 (58%)	5 (42%)	1	7 (54%)	6 (46%)	0,72	8 (61%)	5 (39%)	0,19	7 (78%)	2 (22%)	0,66
Positivo	4 (28%)	10 (72%)		8 (57%)	6 (43%)		10 (62%)	6 (38%)		14 (87%)	2 (13%)		9 (60%)	6 (40%)	

* P valor menor ou igual a 0,005 com significancia estatística.

4.4 PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICO DOS CARCINOMAS DE MAMA EM ADULTAS JOVENS

Uma vez que o miRs regulam diretamente a tradução de proteínas sem que o nível de expressão do mRNA seja alterado, realizamos uma determinação do perfil de proteínas pelo método de *RPPA*. Utilizando o protocolo fornecido pelo *RPPA Core Facility* do MD Anderson Cancer Center, as proteínas totais foram extraídas de 21 amostras tumorais de pacientes do grupo AJ e 9 amostras tumorais do grupo MI, amostras incluídas nas análises anteriores. As quantidades de proteína extraídas variaram de 250 ug/mL a 1883,0 ug/mL (**Quadro 5**).

Quadro 5 - Leitura da dosagem de proteínas para o ensaio de *RPPA*.

Amostras	leitura 1	leitura 2	leitura 3	conc. (µg/mL)
BC-AJ-1004	0,321	0,359	0,511	1025,0
BC-AJ-1006	0,708	0,545	0,457	1556,0
BC-AJ-1007	0,321	0,274	0,187	607,0
BC-AJ-1009	0,285	0,265	0,25	626,0
BC-AJ-2003	0,555	0,516	0,622	1539,0
BC-AJ-2011	0,082	0,244	0,333	240,5
BC-AJ-2024	0,481	0,661	0,498	1485,0
BC-AJ-2037	0,625	0,648	0,69	1815,0
BC-AJ-4025	0,415	0,571	0,491	1318,0
BC-AJ-1011	0,281	0,282	0,308	698,0
BC-AJ-4015	0,604	0,596	0,732	1783,0
BC-AJ-4019	0,504	0,654	0,455	1457,0
BC-AJ-4028	0,695	0,778	0,557	1883,0
BC-AJ-188	0,662	0,568	0,565	1643,0
BC-AJ-33	0,402	0,410	0,413	1236,5
BC-AJ-2036	0,230	0,221	0,222	616,9
BC-AJ-120	0,393	0,396	0,392	1187,1
BC-AJ-118	0,339	0,335	0,332	990,7
BC-AJ-122	0,319	0,332	0,309	939,1
BC-AJ-174	0,229	0,228	0,226	628,2
BC-AJ-175	0,373	0,360	0,363	1091,7
BC-AJ-176	0,458	0,470	0,466	1426,2
BC-MI-128	0,450	0,456	0,446	1379,0
BC-MI-129	0,232	0,235	0,238	652,9
BC-MI-130	0,467	0,456	0,469	1423,9
BC-MI-133	0,336	0,333	0,339	992,9
BC-MI-126	0,447	0,464	0,467	1408,2
BC-MI-125	0,364	0,362	0,371	1092,8
BC-MI-279	0,423	0,435	0,426	1302,7
BC-MI-314	0,367	0,369	0,359	1090,6
BC-MI-178	0,315	0,322	0,328	944,7

No ensaio do *RPPA* foram analisadas 210 proteínas. Dessas proteínas, 33 apresentaram diferença de expressão com 80% ou mais de confiança. Destacando 17 proteínas com aumento de expressão e 16 proteínas com menor expressão no grupo AJ (**Quadro 6**). A análise de vias enriquecidas pelo *WebGestalt* identificou 10 vias biológicas a partir das 33 proteínas, listadas no **Quadro 7**. Essas vias incluem os processos biológicos como: proliferação celular, ciclo celular, apoptose,

desenvolvimento e metabolismo as quais seguem as mesmas funções biológicas relacionadas ao perfil gênico.

Quadro 6 - Perfil de expressão das 33 proteínas diferencialmente expressas (AJ vs MI).

Proteína	Descrição do anticorpo	Afirmação	Confiança
EIF4E	eIF4E-R-V_GBL1113626	AJ < MI	0,9783
RAD50	Rad50-M-V_GBL1113732	AJ < MI	0,9493
STAT5A	Stat5a-R-V_GBL1113620	AJ < MI	0,9081
GSK3B	GSK-3b_pS9-R-V_GBL1113674	AJ < MI	0,9014
PARK7	DJ1-R-V_GBL1113646	AJ < MI	0,9014
ESR1	ER-alpha-R-V_GBL1113958	AJ < MI	0,8986
PXN	Paxillin-R-C_GBL1113607	AJ < MI	0,8986
CTNNB1	b-Catenin-R-V_GBL1113948	AJ < MI	0,8812
EIF4EBP1	4E-BP1-R-V_GBL1113564	AJ < MI	0,8812
GYS1	Gys_pS641-R-V_GBL1113662	AJ < MI	0,8812
MDM2	MDM2_pS166-R-V_GBL1113685	AJ < MI	0,8812
RPS6KA1	RSK-R-C_GBL1113631	AJ < MI	0,8812
RPS6KA2	RSK-R-C_GBL1113631	AJ < MI	0,8812
RPS6KA3	RSK-R-C_GBL1113631	AJ < MI	0,8812
INPP4B	INPP4b-R-V_GBL1113799	AJ < MI	0,8341
NDRG1	NDRG1_pT346-R-V_GBL1113697	AJ < MI	0,8341
RAF1	C-Raf_pS338-R-V_GBL1113903	AJ > MI	0,9783
UBAC1	UBAC1-R-V_GBL1113788	AJ > MI	0,9493
YWHAB	14-3-3-beta-R-V_GBL1113944	AJ > MI	0,9493
CDKN1B	p27_pT198-R-V_GBL1113643	AJ > MI	0,9014
SRC	Src-M-V_GBL1113726	AJ > MI	0,9014
LCK	Lck-R-V_GBL1113595	AJ > MI	0,8986
WWTR1	TAZ-R-V_GBL1113634	AJ > MI	0,8986
RPS6KB1	p70-S6K_pT389-R-V_GBL1113606	AJ > MI	0,8812
STMN1	Stathmin-1-R-V_GBL1113625	AJ > MI	0,8812
CHEK2	Chk2_pT68-R-C_GBL1113902	AJ > MI	0,8341
FOXMI	FoxM1-R-V_GBL1113921	AJ > MI	0,8341
YWHAZ	14-3-3-zeta-R-V_GBL1113945	AJ > MI	0,8341
BCL2L1	Bcl-xL-R-V_GBL1113900	AJ > MI	0,8043
GSK3A	GSK-3ab-M-V_GBL1113747	AJ > MI	0,8043
GSK3B	GSK-3ab-M-V_GBL1113747	AJ > MI	0,8043
NRG1	Heregulin-R-V_GBL1113950	AJ > MI	0,8043
PARP1	PARP1-R-V_GBL1113714	AJ > MI	0,8043

Quadro 7 - Funções biológicas relacionadas às 33 proteínas diferencialmente expressas na comparação entre tumores do grupo AJ e MI (Webgestalt).

Proteína	Nome da proteína
Via de sinalização do ErbB (C=87; O=8; E=0.14; R=58.28; rawP=7.97e-13; adjP=3.43e-11)	
EIF4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
NRG1	<i>neuregulin 1</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
SRC	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i>
Via de sinalização do mTOR (C=52; O=6; E=0.08; R=73.14; rawP=1.81e-10; adjP=3.89e-09)	
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
RPS6KA2	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</i>
EIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EIF4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Via de sinalização das Neurotrofinas (C=127; O=7; E=0.20; R=34.94; rawP=9.44e-10; adjP=1.35e-08)	
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
RPS6KA2	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Ciclo celular (C=124; O=6; E=0.20; R=30.67; rawP=3.68e-08; adjP=3.96e-07)	
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
CHEK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
Via de sinalização da Insulina (C=138; O=6; E=0.22; R=27.56; rawP=6.97e-08; adjP=5.99e-07)	
GYS1	<i>glycogen synthase 1 (muscle)</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
EIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EIF4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Via do Câncer (C=326; O=7; E=0.51; R=13.61; rawP=6.19e-07; adjP=3.33e-06)	
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
CTNNB1	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>

Cont/ Quadro 7

Meiose Oocytose (C=112; O=5; E=0.18; R=28.30; rawP=8.39e-07; adjP=4.01e-06)	
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
RPS6KA2	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Maturação oocítica mediada por progesterona (C=86; O=4; E=0.14; R=29.48; rawP=9.89e-06; adjP=3.54e-05)	
RPS6KA2	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Via de sinalização da MAPK (C=268; O=5; E=0.42; R=11.83; rawP=5.83e-05; adjP=0.0002)	
RPS6KA2	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</i>
STMN1	<i>stathmin 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Via de sinalização do p53 (C=68; O=2; E=0.11; R=18.64; rawP=0.0051; adjP=0.0084)	
CHEK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>

Além disso 24 proteínas podem ser reguladas por pelo menos 1 dos 8 miRs resultantes deste trabalho, uma vez que o correspondente gene foi alvo nas análises de predição, e portanto, foi nomeado como miR-proteína (**Quadro 8**). Destas 24 miR-proteínas 15 seguiram a regulação direta, ou seja, a proteína apresentou um aumento de expressão, e o respectivo miR mostrou uma diminuição de expressão, e vice versa. As 9 miR-proteínas restantes, apesar de serem diferencialmente expressas, não seguem essa regulação direta do miR, sugerindo regulação por outros mecanismos. A **Figura 17** mostra um fluxograma com os resultados das proteínas.

Quadro 8 - Representação das 24 miR-proteínas diferencialmente expressas e reguladas por pelo menos 1 miR.

Proteína	Nome da Proteína	Afirmação_ proteína	Confiança_ proteína	Alvo de pelo menos 1 miR
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	AJ < MI	0,9783	↑miR-9
RAD50	RAD50 homolog	AJ < MI	0,9493	↑miR-9
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	AJ < MI	0,9081	↑miR-18b
ESR1	Estrogen receptor	AJ < MI	0,8986	↑hsa-miR-9
PXN	paxillin	AJ < MI	0,8986	↑hsa-miR-9
EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	AJ < MI	0,8812	↑miR-18b
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1	AJ < MI	0,8812	↑miR-33b
GYS1	glycogen synthase 1 (muscle)	AJ < MI	0,8812	↑miR-106a
MDM2	Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	AJ < MI	0,8812	↑miR-106a
RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	AJ < MI	0,8812	↑miR-106b
RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	AJ < MI	0,8812	↑miR-9
RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	AJ < MI	0,8812	↑miR-518a-3p
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	AJ < MI	0,8341	↑miR-9
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	AJ > MI	0,9783	↑miR-106a
YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	AJ > MI	0,9493	↑miR-106a
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	AJ > MI	0,9014	↑miR-9
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	AJ > MI	0,9014	↑miR-9
LCK	LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	AJ > MI	0,8986	↑miR-18b
RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, beta polypeptide 1	AJ > MI	0,8812	↑miR-33b
STMN1	stathmin 1	AJ > MI	0,8812	↑miR-210
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	AJ > MI	0,8341	↓hsa-miR-372
BCL2L1	BCL-2 protein family	AJ > MI	0,8043	↑miR-9
NRG1	neuregulin 1	AJ > MI	0,8043	↑miR-18b
PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1	AJ > MI	0,8043	↓hsa-miR-372

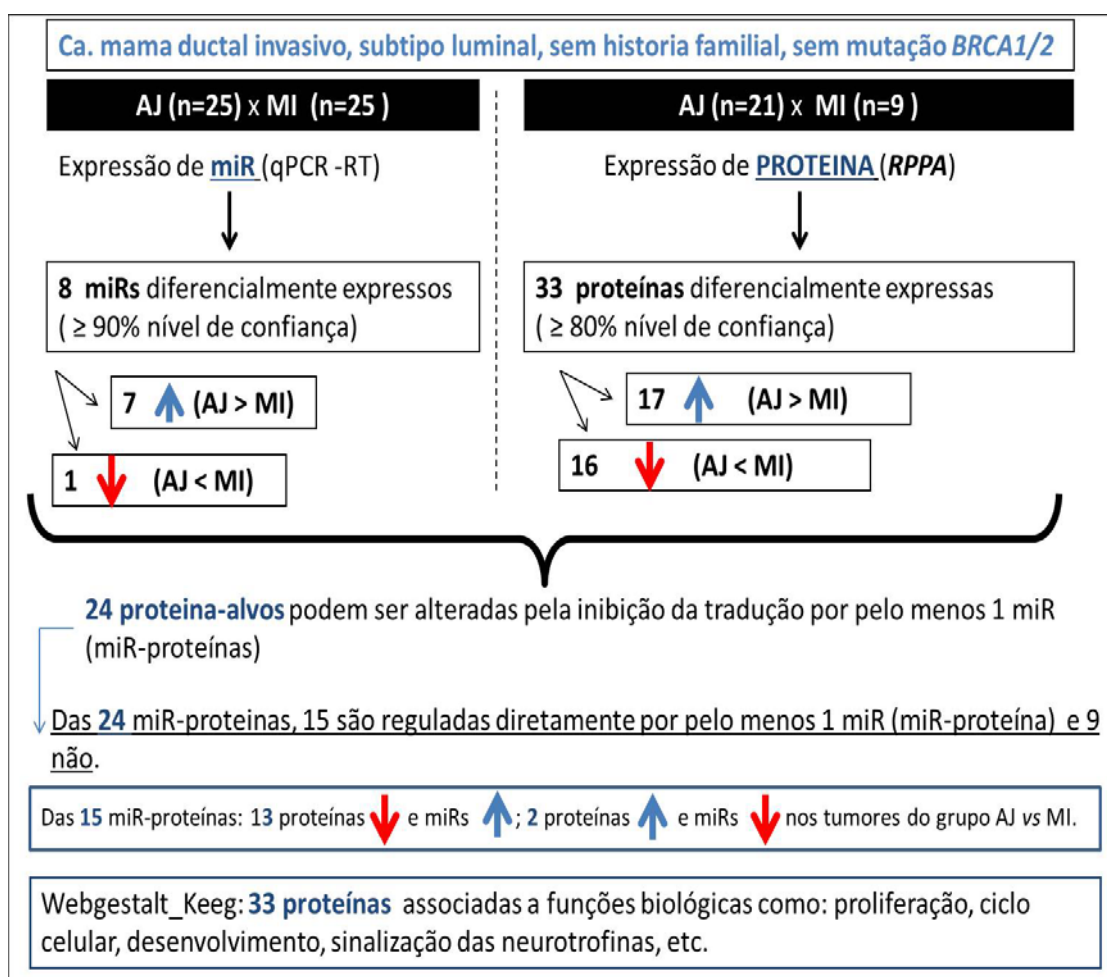


Figura 17 - Fluxograma representando os resultados dos miRs e proteínas. Dentre as 33 proteínas 17 proteínas apresentaram aumento de expressão e 16 proteínas menor expressão no grupo AJ. A integração dos resultados de miR e proteínas resultou em 24 proteína-alvos (miR-proteína), sendo que 15 miR-proteína seguiram a regulação direta. Os processos biológicos como proliferação celular, ciclo celular, apoptose, desenvolvimento e metabolismo foram relacionadas às 33 proteínas.

Para a análise de classificação das amostras a partir das 24 proteínas reguladas pelos miRs foi selecionada uma combinação de 8 proteínas (RAF1, BCL2L1, EIF4E, STAT5A, PARP1, ESR1, RPS6KA1 e YWHAZ), sendo 4 miR-proteínas com maior expressão e 4 miR-proteínas com menor expressão. Esta combinação de proteínas foi capaz de classificar os grupos de pacientes corretamente com acurácia de 95% para as pacientes do grupo AJ e 89% para as pacientes do grupo MI (**Figura 18**),

mostrando que a combinação de 8 proteínas foram capazes de separar os dois grupos. O valor de corte da classificação foi 0,22, portanto as amostras com o valor $> 0,22$ foram classificadas como o grupo AJ, e as amostras com valores $< 0,22$ foram classificadas como o grupo MI. No gráfico da **Figura 14**, foi adotada uma escala de 0 a 0,7 para permitir a visualização da classificação, no entanto quatorze amostras do grupo AJ permaneceram mais dispersas ($>0,7$).

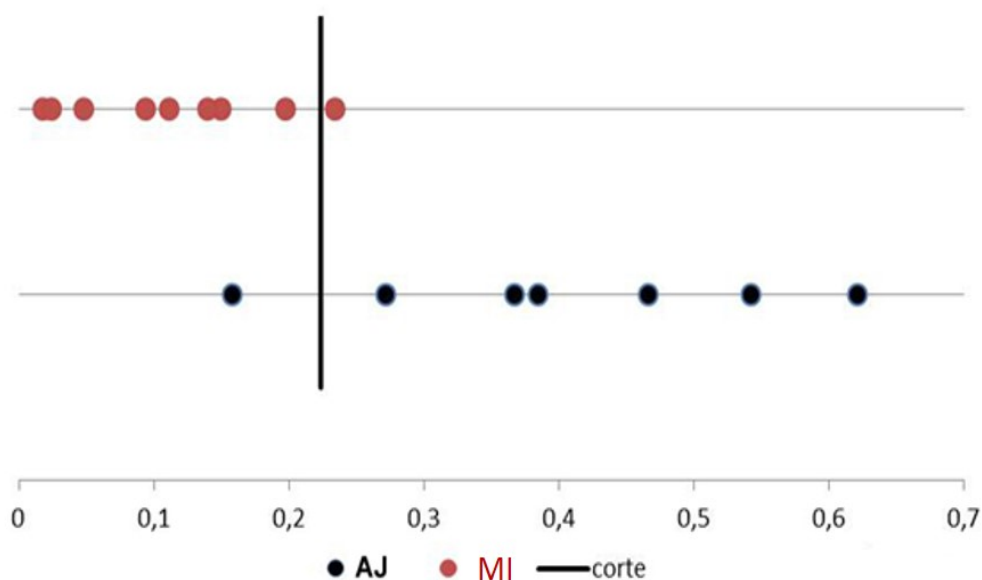


Figura 18 - Análise de classificação das amostras utilizando a combinação de 8 proteínas reguladas pela ação de pelo menos um miR. As amostras do grupo AJ (azul) se distribuíram acima do valor de corte, exceto uma amostra. Já as amostras do grupo MI (vermelho) se distribuíram abaixo do valor de corte, exceto uma amostra.

Para determinar a interação entre as 24 proteínas, e portanto compreender suas funções nesses tumores, utilizamos o programa iRefIndex, que integram banco de dados com interações proteína-proteína validadas (interatoma). Nesta análise, encontramos 20 proteínas interconectadas (**Figura 19**), sugerindo que a regulação

direta ou indireta pelos miRs pode agir sob um complexo de proteínas com funções interligadas nos tumores do grupo AJ, e este mesmo complexo proteico pode atuar diferentemente nos tumores do grupo MI. As vias biológicas destacadas na análise do *WebGestalt* a partir das 20 proteínas foram listadas no **Quadro 9**. As principais funções biológicas associadas a estas proteínas foram: ciclo celular, proliferação, apoptose, metabolismo e desenvolvimento.

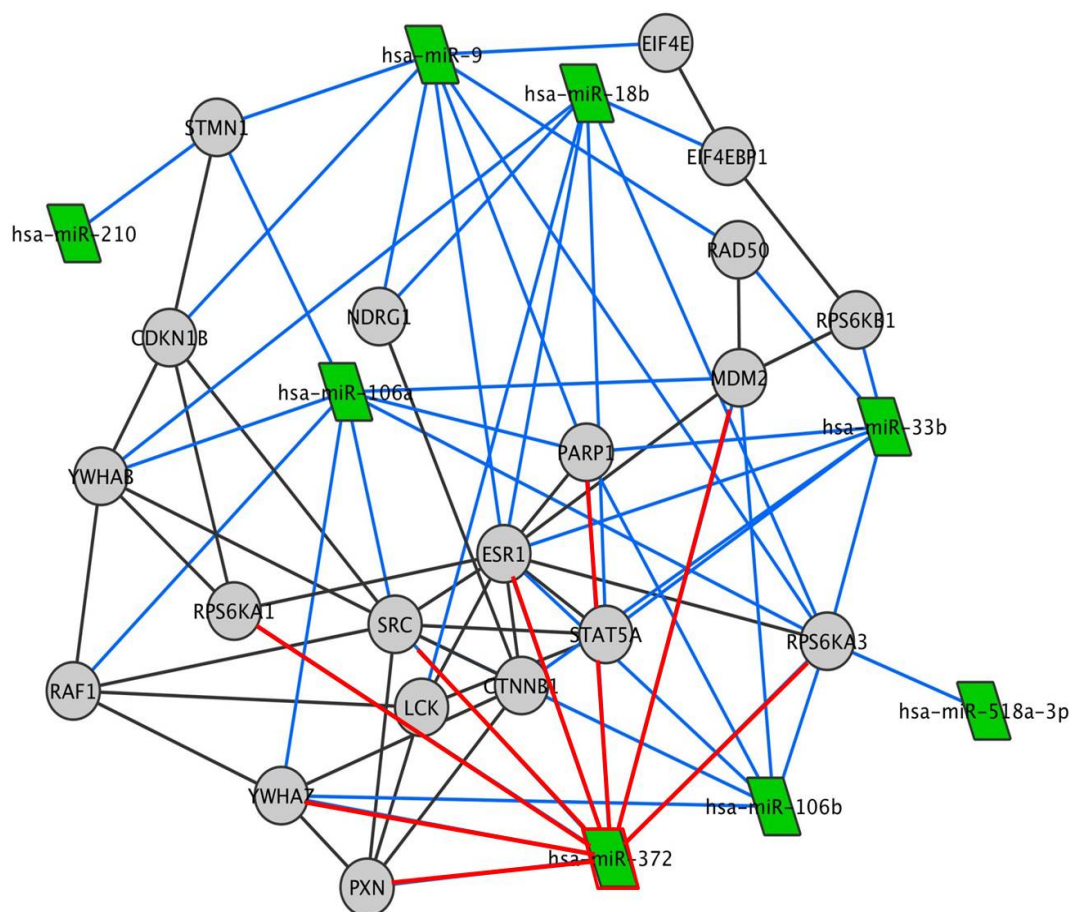


Figura 19 - Representação das 20 proteínas reguladas diretamente ou indiretamente pelo miR que apresentaram interação proteína-proteína (arestas pretas). Foram simulados os respectivos miRs diferencialmente expressos (quadrado verde) e sua regulação representada por arestas em azul (regulação ativa) e vermelha (regulação inativa).

Quadro 9 - Funções biológicas relacionadas às 20 proteínas interconectadas diferencialmente expressas cuja regulação via miR é direta ou indireta na comparação entre tumores do grupo AJ e MI (*Webgestalt*).

Proteína	Nome da proteína
Via de sinalização do ErbB (C=87; O=6; E=0.04; R=148.71; rawP=2.14e-12; adjP=7.49e-11)	
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
EIF4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
SRC	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Via de sinalização do mTOR (C=52; O=5; E=0.02; R=207.34; rawP=3.20e-11; adjP=5.60e-10)	
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
EIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EIF4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Via de sinalização das Neurotrofinas (C=127; O=5; E=0.06; R=84.90; rawP=3.06e-09; adjP=3.57e-08)	
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Meiose Oocytose (=112; O=4; E=0.05; R=77.01; rawP=2.02e-07; adjP=1.01e-06)	
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Ciclo celular (C=124; O=4; E=0.06; R=69.56; rawP=3.04e-07; adjP=1.31e-06)	
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
Via do Câncer (C=326; O=5; E=0.15; R=33.07; rawP=3.38e-07; adjP=1.31e-06)	
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
CTNNB1	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ERS1	<i>estrogen receptor</i>
Via de sinalização da Insulina (C=138; O=4; E=0.06; R=62.50; rawP=4.67e-07; adjP=1.63e-06)	
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>
EIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EIF4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Via de sinalização da MAPK (C=268; O=4; E=0.12; R=32.18; rawP=6.53e-06; adjP=1.52e-05)	
STMN1	<i>stathmin 1</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>

4.4.1 Associação da expressão de proteínas e dados clinicopatológicos

O alto nível da expressão da proteína RAF1 e o baixo nível da expressão da proteína STAT5 foram estatisticamente associados ($P = 0,02$ e $P = 0,002$, respectivamente) com o TNM avançado. O alto nível da expressão de PARP1 e o baixo nível da expressão de RPS6KA1 foram estatisticamente associados ($P = 0,03$ e $P = 0,033$, respectivamente) com linfonodo positivo. O maior diâmetro do tumor (≥ 2 cm) foi estatisticamente associado ($P = 0,02$) com o baixo nível de expressão de RPS6KA1. Foi observado uma associação entre os altos níveis de expressão das proteínas RAF1, BCL2L, PARP1, YWHAZ e o alto grau nuclear. O baixo nível de expressão de STAT5 e alto nível de PARP1 foram associados com tumores maiores (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação da expressão de proteínas e dados clinicopatológicos

Proteína	Grau nuclear			Grau histológico			Tamanho do tumor			TNM			K167			Linfonodo		
	1 e 2	3	P	1 e 2	3	P	< 2 cm	≥ 2 cm	P	I e II	III e IV	P	negativo	positivo	P	negativo	positivo	P
RAF↑																		
Negativo	12(46%)	14 (54%)	0,12	19 (76%)	6 (24%)	0,065	20 (77%)	6 (23%)	0,07	25 (89%)	3 (11%)	0,02*	10 (38%)	16 (62%)	0,33	18 (78%)	5 (22%)	1
Positivo	4 (21%)	15 (79%)		9 (47%)	9 (41%)		11 (50%)	11 (50%)		13 (59%)	9 (41%)		4 (21%)	15 (79%)		13 (76%)	4 (24%)	
BCL2L1↑																		
Negativo	4 (36%)	7 (64%)	0,68	7 (70%)	3 (30%)	0,43	8 (67%)	4 (33%)	0,47	10 (83%)	2 (17%)	0,25	1 (10%)	9 (90%)	0,35	8 (89%)	1 (11%)	0,61
Positivo	4 (27%)	11 (73%)		8 (50%)	8 (50%)		9 (50%)	9 (50%)		11 (61%)	7 (39%)		5 (31%)	11 (69%)		10 (71%)	4 (29%)	
EIF4E↓																		
Negativo	12 (43%)	16 (57%)	0,22	22 (76%)	7 (24%)	0,03*	18 (62%)	11 (38%)	0,76	23 (74%)	8 (26%)	1	9 (35%)	17 (65%)	0,74	15 (71%)	6 (29%)	0,48
Positivo	4 (23%)	13 (77%)		6 (40%)	9 (60%)		13 (68%)	6 (32%)		15 (79%)	4 (21%)		5 (26%)	14 (74%)		16 (84%)	3 (16%)	
STAT5↓																		
Negativo	1 (10%)	9 (90%)	0,09	6 (50%)	6 (50%)	0,69	5 (39%)	8 (61%)	0,14	5 (38%)	8 (62%)	0,002*	4 (40%)	6 (60%)	0,16	7 (78%)	2 (22%)	1
Positivo	7 (44%)	9 (56%)		15 (64%)	5 (36%)		12 (71%)	5 (29%)		16 (94%)	1 (6%)		2 (13%)	14 (88%)		11 (79%)	3 (21%)	
PARP1↑																		
Negativo	1 (12%)	7 (88%)	0,36	4 (50%)	4 (50%)	0,68	8 (80%)	2 (20%)	0,12	7 (70%)	3 (30%)	1	1 (11%)	8 (89%)	0,38	4 (50%)	4 (50%)	0,03*
Positivo	7 (39%)	11 (61%)		11 (61%)	7 (39%)		9 (45%)	11 (55%)		14 (70%)	6 (30%)		5 (29%)	12 (71%)		14 (93%)	1 (7%)	
ESR1↓																		
Negativo	3 (18%)	14 (82%)	0,07	9 (53%)	8 (47%)	0,68	10 (59%)	7 (41%)	1	12 (71%)	5 (29%)	1	3 (19%)	13 (81%)	0,64	9 (64%)	5 (36%)	0,12
Positivo	5 (56%)	4 (44%)		6 (67%)	3 (33%)		7 (54%)	6 (46%)		9 (69%)	4 (31%)		3 (30%)	7 (70%)		9 (100%)	0 (0%)	
RPS6KA1↓																		
Negativo	1 (11%)	8 (89%)	0,19	4 (44%)	5 (56%)	0,42	2 (22%)	7 (78%)	0,02*	6 (67%)	3 (33%)	1	3 (38%)	5 (63%)	0,33	4 (50%)	4 (50%)	0,03*
Positivo	7 (41%)	10 (59%)		11 (65%)	6 (35%)		15 (75%)	6 (29%)		15 (71%)	6 (29%)		3 (17%)	15 (83%)		14 (93%)	1 (7%)	
YWHAZ↑																		
Negativo	4 (40%)	6 (60%)	0,66	7 (70%)	3 (30%)	0,43	15 (65%)	8 (35%)	1	10 (77%)	3 (23%)	0,69	2 (20%)	8 (80%)	1	9 (90%)	1 (10%)	0,34
Positivo	4 (25%)	12 (75%)		8 (50%)	8 (50%)		16 (64%)	9 (36%)		11 (65%)	6 (35%)		4 (25%)	12 (75%)		9 (69%)	4 (31%)	

* P valor menos ou igual a 0,005 com significancia estatística.

4.5 INTEGRAÇÃO DOS DADOS DE MIRS, GÊNICOS E PROTEICOS

Nós investigamos se ocorreu nos tumores um dos mecanismos de regulação dos miRs, cuja a degradação do transcrito altera o nível proteico. Desse modo, comparando a combinação dos 440 miR:mRNAs diretos com os 15 miR:proteínas diretos, identificamos três proteínas (ESR1, RPS6KA1, YWHAZ), e, concomitantemente observamos que a expressão do mRNA seguia a expressão proteica. Essa interação denominamos miR:mRNA:proteínas. Esses resultados sugerem que a regulação do miR correu de forma linear (ou direta). Dado este achado, investigamos se apenas as 3 proteínas eram capazes de exercer funções importantes nesses tumores. Na análise de interação destas três proteínas com novas proteínas (interatoma) que se conectam diretamente (1º nível), identificamos a proteína ESR1 formando interações com 343 proteínas. Adicionalmente, também encontramos a proteína RPS6KA1 interagindo com 51 proteínas, e a proteína YWHAZ conectando-se com 195 proteínas, formando uma rede complexa (**Figura 20**). As vias enriquecidas a partir de todas as proteínas presentes no interatoma foram listadas no **Quadro 10**. As funções biológicas como proliferação, ciclo celular, apoptose, desenvolvimento e metabolismo foram associadas a essas proteínas. Nossos resultados sugerem que as proteínas ESR1, RPS6KA1, YWHAZ, e seus respectivos miRs reguladores (miR-9,18b, 33b 106a/b e miR-372), podem influenciar a tumorigenese das pacientes do grupo AJ, e possivelmente, ser potenciais marcadores moleculares de agressividade e alvos terapêuticos futuros desses casos específicos.

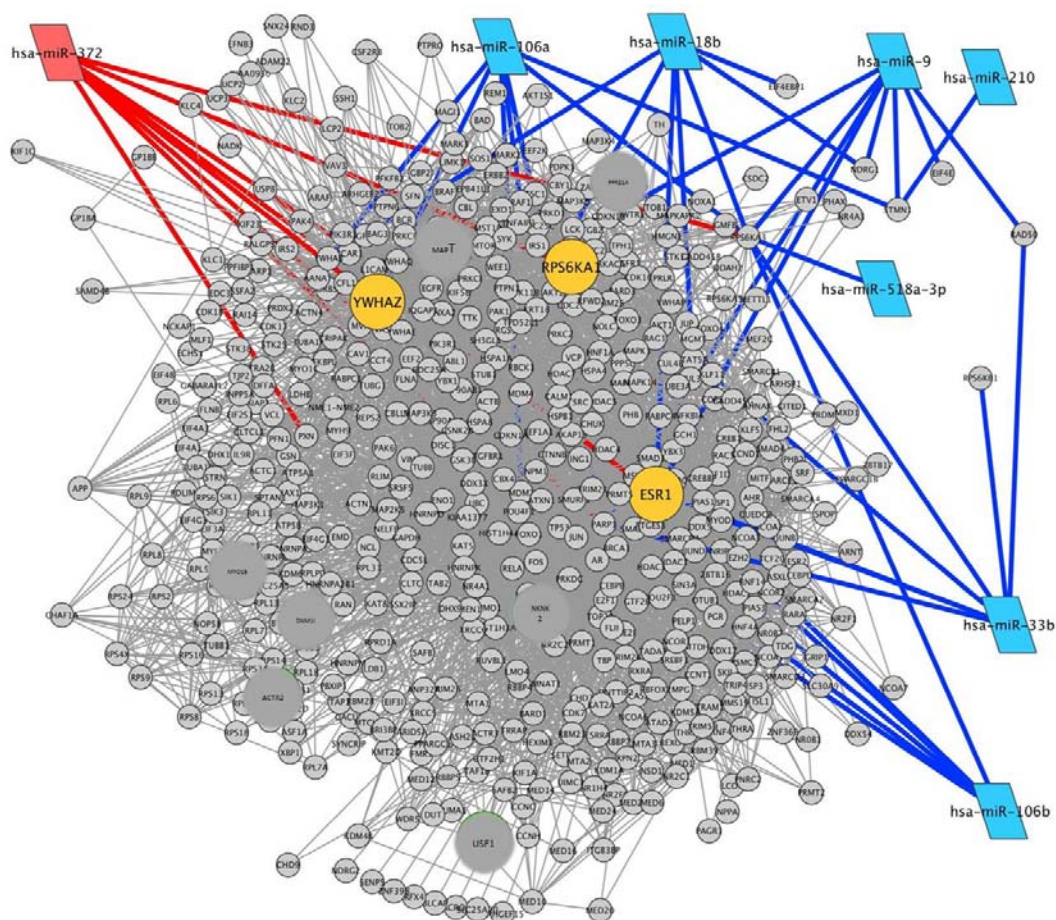


Figura 20 - Interatoma. A partir das 3 interações miR:mRNA:proteínas (miR-9:ESR1, miR-372:YWHAZ, miR-372:RPS6KA1, na cor laranja) resultou em uma rede de interações com novas proteínas (azul). Algumas proteínas interagem com os miR-9, miR-18b, miR-33b, miR-106a/b, miR-210, miR-372, miR-518b (amarelo).

Quadro 10 - Vias enriquecidas, dada pelo *Webgestalt*, a partir do interatoma envolvendo 3 miR:mRNA:proteínas.

Proteína	Nome da proteína
Via do Câncer (C=326; O=58; E=4.04; R=14.37; rawP=6.02e-49; adjP=7.22e-47)	
EP300	<i>E1A binding protein p300</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
FOXO1	<i>forkhead box O1</i>
JUP	<i>junction plakoglobin</i>
MTOR	<i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RXRA	<i>retinoid X receptor, alpha</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
TGFBR1	<i>transforming growth factor, beta receptor 1</i>
CHUK	<i>conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
PRKCA	<i>protein kinase C, alpha</i>
RAC3	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3)</i>
ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
CCND1	<i>cyclin D1</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
PIAS1	<i>protein inhibitor of activated STAT 1</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
CTNNB1	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>
MITF	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
MSH2	<i>mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)</i>
PIK3R3	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
HSP90AA1	<i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1</i>
RELA	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
RARA	<i>retinoic acid receptor, alpha</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ZBTB16	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
HSP90AB1	<i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
CBL	<i>Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FGFR1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
SMAD3	<i>SMAD family member 3</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
PIAS3	<i>protein inhibitor of activated STAT, 3</i>
SMAD2	<i>SMAD family member 2</i>
ARAF	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
NFKBIA	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>

AR	<i>androgen receptor</i>
HDAC1	<i>histone deacetylase 1</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
HDAC2	<i>histone deacetylase 2</i>
Via de sinalização da MAPK (C=268; O=49; E=3.32; R=14.77; rawP=4.75e-42; adjP=1.90e-40)	
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
MAP2K5	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
GADD45G	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TGFBR1	<i>transforming growth factor, beta receptor 1</i>
CHUK	<i>conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
PRKCA	<i>protein kinase C, alpha</i>
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
RPS6KA5	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5</i>
PRKACA	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>
HSPA1A	<i>heat shock 70kDa protein 1A</i>
RAC3	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3)</i>
FLNB	<i>filamin B, beta</i>
JUND	<i>jun D proto-oncogene</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
MKNK2	<i>MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2</i>
CDC25B	<i>cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)</i>
RELA	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>
MAP3K1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MAP3K3	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>
PAK1	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
NR4A1	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
HSPA8	<i>heat shock 70kDa protein 8</i>
FLNA	<i>filamin A, alpha</i>
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
FGFR1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
MAPKAPK2	<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
MAP3K4	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>
TAB2	<i>TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2</i>
GADD45B	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, beta</i>
SRF	<i>serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)</i>
NFATC4	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4</i>
MAP3K5	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>
PPP5C	<i>protein phosphatase 5, catalytic subunit</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
HSPB1	<i>heat shock 27kDa protein 1</i>
ZAK	<i>sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>

MAPT	<i>microtubule-associated protein tau</i>
MEF2C	<i>myocyte enhancer factor 2C</i>
Via de sinalização das Neurotrofinas (C=127; O=37; E=1.57; R=23.53; rawP=4.09e-40; adjP=9.82e-39)	
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
MAP2K5	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
YWHAE	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
RPS6KA5	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5</i>
FOXO3	<i>forkhead box O3</i>
ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
SHC1	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
PIK3R3	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
RELA	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>
MAP3K1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MAP3K3	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
CALM1	<i>calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
YWHAQ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
IRS2	<i>insulin receptor substrate 2</i>
IRS1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
MAPKAPK2	<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
NFKBIA	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
MAP3K5	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>
YWHAH	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
Ciclo celular (C=124; O=32; E=1.54; R=20.84; rawP=5.91e-33; adjP=1.18e-31)	
EP300	<i>E1A binding protein p300</i>
GADD45G	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
YWHAE	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>
ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
CCND1	<i>cyclin D1</i>
WEE1	<i>WEE1 homolog (S. pombe)</i>
MDM2	<i>Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
TTK	<i>TTK protein kinase</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
CDC25B	<i>cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)</i>
ZBTB17	<i>zinc finger and BTB domain containing 17</i>

CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>)
CCNH	cyclin H
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
CDK7	cyclin-dependent kinase 7
CDC25C	cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>)
SMAD3	SMAD family member 3
SMAD2	SMAD family member 2
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
E2F1	E2F transcription factor 1
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta
HDAC1	histone deacetylase 1
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
SMAD4	SMAD family member 4
HDAC2	histone deacetylase 2
SFN	Stratifin
YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide
Adesão focal (C=200; O=37; E=2.48; R=14.94; rawP=3.48e-32; adjP=5.97e-31)	
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
PRKCA	protein kinase C, alpha
PAK4	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
RAC3	ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3)
FLNB	filamin B, beta
PAK6	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6
JUN	jun proto-oncogene
CCND1	cyclin D1
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)
VCL	Vinculin
PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
VAV3	vav 3 guanine nucleotide exchange factor
PXN	Paxillin
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
SOS1	son of sevenless homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
ACTN1	actinin, alpha 1
FLNA	filamin A, alpha
CAV1	caveolin 1, caveolae protein 22kDa
BCAR1	breast cancer anti-estrogen resistance 1
EGFR	epidermal growth factor receptor
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta
ACTN4	actinin, alpha 4
ACTB	actin, beta

MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
Via de sinalização do ErbB (C=87; O=28; E=1.08; R=25.99; rawP=4.95e-32; adjP=7.43e-31)	
PAK1	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
MTOR	<i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
CBL	<i>Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
PRKCA	<i>protein kinase C, alpha</i>
PAK4	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4</i>
SRC	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
PAK6	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
ARAF	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
SHC1	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
PIK3R3	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
Via de sinalização da Insulina (C=138; O=32; E=1.71; R=18.73; rawP=2.51e-31; adjP=3.35e-30)	
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
FOXO1	<i>forkhead box O1</i>
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
MTOR	<i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
PPP1R3A	<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A</i>
PRKACA	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>
PTPN1	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1</i>
SHC1	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
PRKCI	<i>protein kinase C, iota</i>
RPS6	<i>ribosomal protein S6</i>
SREBF1	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
PIK3R3	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
MKNK2	<i>MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2</i>
PDPK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
CALM1	<i>calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
CBL	<i>Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
IRS2	<i>insulin receptor substrate 2</i>
IRS1	<i>insulin receptor substrate 1</i>

BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
ARAF	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
PRKCZ	<i>protein kinase C, zeta</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
PPARGC1A	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
Via de sinalização do mTOR (C=52; O=16; E=0.64; R=24.85; rawP=1.68e-18; adjP=7.75e-18)	
PDPK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
EIF4B	<i>eukaryotic translation initiation factor 4B</i>
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
MTOR	<i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
RPS6	<i>ribosomal protein S6</i>
PIK3R3	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
STK11	<i>serine/threonine kinase 11</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
Meiose Oocytose (C=112; O=15; E=1.39; R=10.82; rawP=1.06e-11; adjP=3.03e-11)	
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
RPS6KA1	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>
CALM1	<i>calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)</i>
YWHAQ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>
AR	<i>androgen receptor</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
YWHAH	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
CDC25C	<i>cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)</i>
PRKACA	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>
YWHAH	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide</i>
PGR	<i>progesterone receptor</i>
YWHAB	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide</i>
RPS6KA3	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
Apoptose (C=87; O=13; E=1.08; R=12.07; rawP=6.18e-11; adjP=1.61e-10)	
CSF2RB	<i>colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
DFFA	<i>DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide</i>
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
NFKBIA	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
PIK3R3	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
CHUK	<i>conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
PRKACA	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>
RELA	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>

Um dos motivos pelo qual encontramos poucos casos de regulação linear entre miR:mRNA:proteína nos nossos resultados pode ser devido aos critérios restritos que adotamos para a seleção tanto de alvos preditos como o valor de corte de expressão diferencial dos, miRs, mRNAs e proteínas. Embora o método de *RPPA* inclua proteínas envolvidas com proliferação, ciclo celular, as 210 proteínas analisadas neste método são limitadas em comparação com o grande número de genes presentes no *microarray*.

4.6 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS REGULADAS LINEARMENTE PELA AÇÃO DO MIR

Para a validação e localização celular/tecidual das proteínas com potencial de serem biomarcadores consideramos os seguintes critérios: 1) são diferencialmente expressos ($\geq 80\%$ de confiança) entre os tumores do grupo AJ e MI; b) são capazes de classificar com alta acurácia os tumores dos dois grupos; c) são alvos preditos e regulados diretamente por pelo menos um dos oito miRs, realizamos um TMA com amostras independentes (seguindo os mesmos critérios de inclusão e exclusão deste estudo). Os blocos de parafina de 37 pacientes foram recuperados do Arquivo do A.C. Camargo Cancer Center e após análise do patologista, foi possível a construção do TMA. A partir de blocos de parafina de 21 casos do grupo AJ e 16 casos do grupo MI foi retirado cilindros (1mm de diâmetro) e disponibilizados em triplicata para aumentar a acurácia das análises. Esse TMA foi reservado para o presente projeto e também para outros projetos do nosso grupo finalizando com o total de 42 amostras em triplicata (**Figura 21**).

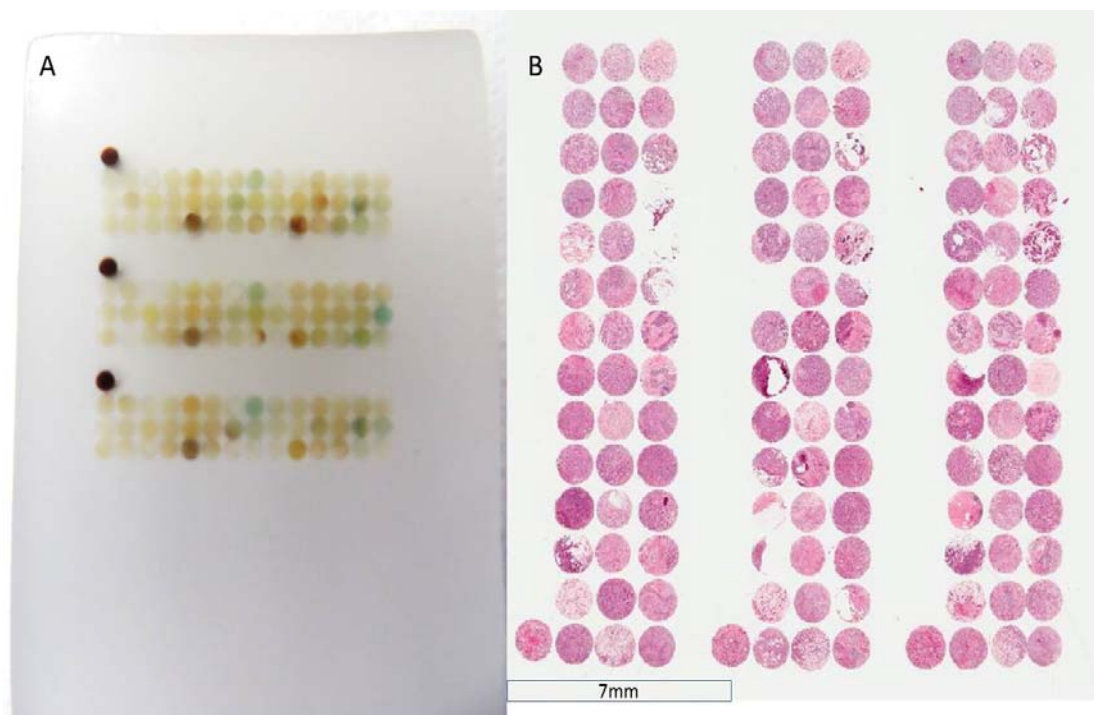
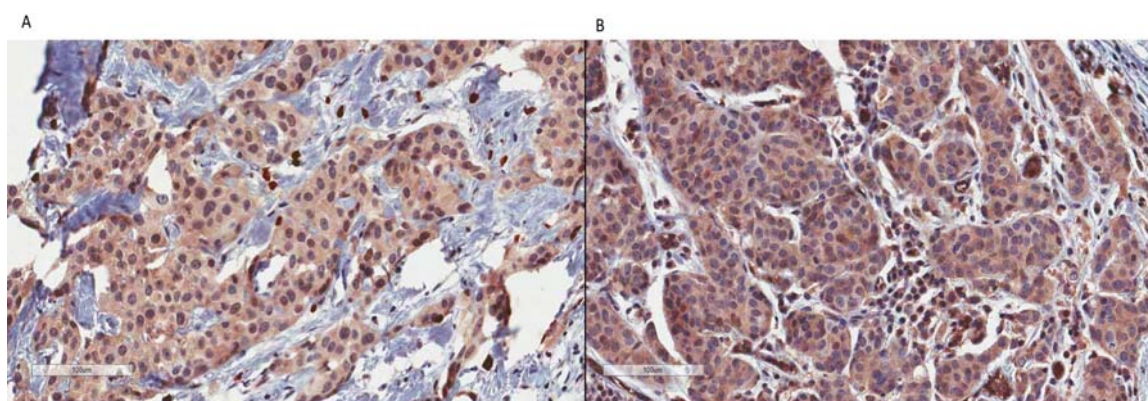


Figura 21 - TMA. Bloco de parafina contendo os 42 punches (casos) em triplicata (A), com a marcação do HE (B).

Foi realizado a marcação da proteína *ribosomal protein S6 kinase alfa1* (RPS6KA1) com o anticorpo RSK1. As imagens foram adquiridas por um escaneador de imagens e a intensidade e positividade da marcação da proteína das amostras foram avaliadas utilizando o programa *APERIO ImageScope*. Os valores de expressão de RSK1 foram categorizados em forte ou fraca marcação de acordo com o valor da mediana da expressão. Todas as amostras foram analisadas aleatoriamente e o padrão de expressão foi avaliado de forma quantitativa, em que os níveis de expressão foram representados pela porcentagem de células positivas e a intensidade de imunomarcação ($HSCORE = \sum(i \times P_i)$, em que P_i = porcentagem de pixels positivos, variando de 0 a 100% e a intensidade da coloração do pixel $i = 0, 1, 2$ ou 3) (ALVARENGA et al. 2013).

A expressão de RSK1 se revelou como uma fraca marcação predominantemente citoplasmática nas células epiteliais dos tumores do grupo AJ, o que não foi observado nas células tumorais do grupo MI (**Figura 22**). Os valores de expressão de RSK1 foram plotados em gráfico de barras utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0 (**Figura 23**). Portanto a análise de imunohistoquímica resultou na confirmação do baixo nível de expressão da proteína RSK1 nos tumores do grupo AJ.



100um

Figura 22 - Marcação de RSK1 representando fraca expressão nos tumores AJ (A) e forte expressão de RSK1 nos tumores MI (B).

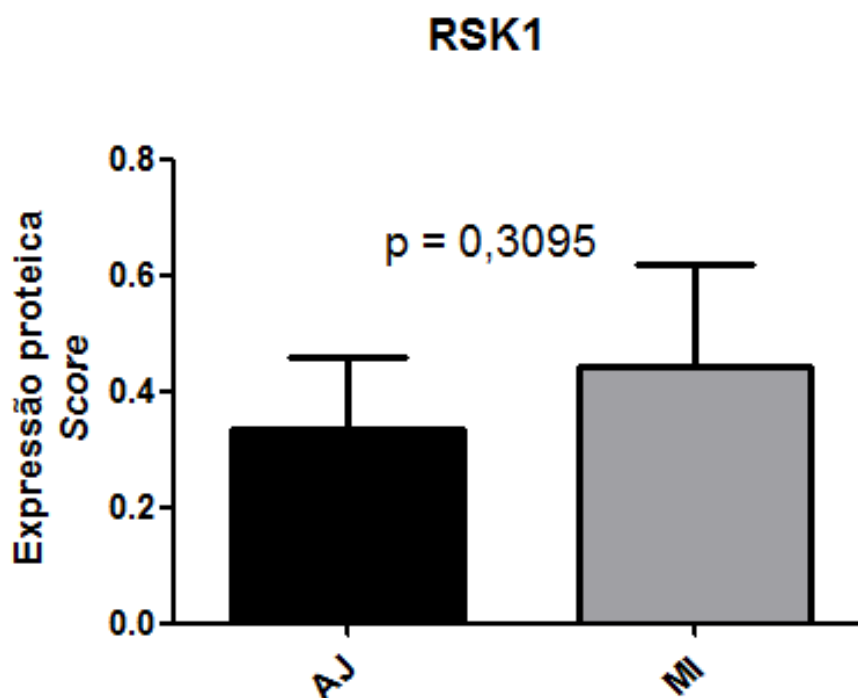


Figura 23 - Gráfico de barras representando a marcação fraca e forte da proteína RSK1 nos grupos AJ e MI.

O programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), foi utilizado para aplicar o teste do Qui Quadrado e o teste de Fisher para verificar a associação entre a expressão da proteína RSK1 e os diferentes grupos de variáveis clinicopatológicas. A associação dos dados clinicopatológicos com a fraca expressão da proteína RSK1 demonstrou que 47% das pacientes apresentaram grau histológico 3 e 86% pacientes apresentaram grau nuclear 3. Dentre a categoria TNM III e IV a maioria das pacientes apresentou fraca expressão de RSK1 (**Figura 24 e Tabela Anexo 3**). As pacientes que apresentaram Ki67 positivo e tamanho grande do tumor apresentaram fraca expressão de RSK1 em 80% e 87%, respectivamente (**Tabela Anexo 3**).

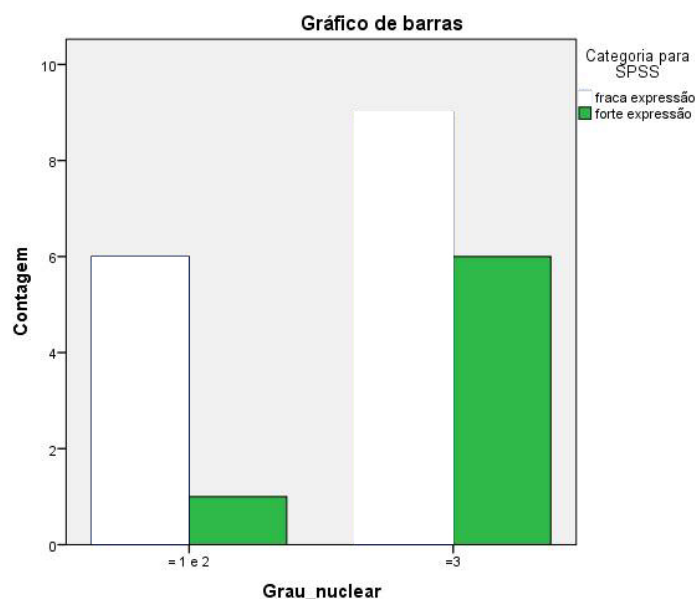


Figura 24 - Gráfico de barras representando a marcação fraca e forte da proteína RSK1 nos grupos AJ e MI.

4.7 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICO DO MICROAMBIENTE TUMORAL (ESTROMA) - MICROARRAY

4.7.1 Quantidade e qualidade do RNA total do estroma enriquecido de fibroblastos por LCM

O RNA total extraído do estroma enriquecido de fibroblastos (SE) atingiu a quantidade entre 92 a 176 ng (**Tabela 8**). O baixo rendimento de RNA pode ter sido consequência de vários fatores: a) tempo longo de exposição do tecido tumoral à temperaturas altas do laser incidente; b) tempo longo de isquemia fria do tecido no momento da congelação no centro cirúrgico; c) presença demasiada de colágeno que prejudica a quantidade de fibroblasto disponível; d) desmoplasia no tecido devido a inflamação acentuada, portanto menos fibroblastos disponíveis; e) região tumoral rica em células epiteliais prejudica a captura de células estromais stroma devido ao

grande diâmetro do laser (maior contaminação com células epiteliais), nesses casos optamos por perder estroma para evitar essa contaminação. No material proveniente do *LCM* a análise no *Bioanalyzer* não foi realizada para evitar maior perda de RNA, portanto todo o material obtido foi utilizado no processo de amplificação e em seguida a marcação. A atividade específica e rendimento do procedimento da marcação foram considerados satisfatórios com valores ≥ 5 e ≥ 0.825 , respectivamente (**Tabela 8**). A **Figura 25** mostra a captura do material de um dos casos.

Tabela 8 - Qualidade e quantidade do RNA total extraído, amplificado e marcado a partir do estroma enriquecido de fibroblastos pelo LCM.

Amostra (LCM)	Percentual do estroma tumoral	n° de tiros (LCM)	Extração RNA total		aRNA (2ºRound) - marcado				Cálculo	
			ng/uL	260/280	ng/uL	260/280	Cy3 (referencia)	Cy5 (amostra)	Atividade específica	Rendimento
BC-AJ-118	40	4550	11,7	1,6	248	2,5	-	1,5	6	4,966
BC-AJ-174	70	2900	13,9	1,41	85	2,27	-	0,6	7	1,704
BC-AJ-175	60	4587	17,2	1,46	106	2,55	-	0,9	8	2,128
BC-AJ-337	30	5522	12,6	1,49	459	2,27	-	3,2	7	9,176
BC-AJ-1004	40	3606	21	1,52	74	2,27	-	0,4	5	1,478
BC-AJ-2036	30	1389	14,1	1,46	66	2,55	-	0,4	6	1,324
BC-AJ-4011	70	3891	19,6	1,48	76	2,49	-	0,6	8	1,510
BC-AJ-4028	30	2340	11	1,46	148	2,55	-	1,3	9	2,960
BC-MI-42	50	5396	10,6	1,6	321	2,3	-	2,6	8	6,410
BC-MI-48	40	2156	13,8	1,6	190	2,55	-	1	5	3,800
BC-MI-49	55	2166	10,2	1,46	169	2,55	-	1	6	3,380
BC-MI-50	35	3563	15,1	1,46	274	2,55	-	1,9	7	5,478
BC-MI-128	40	4000	17,9	1,41	40	2,21	-	0,3	7	0,808
Referencia universal	-	-	100	2,2	435	2,29	10	-	23	8,698

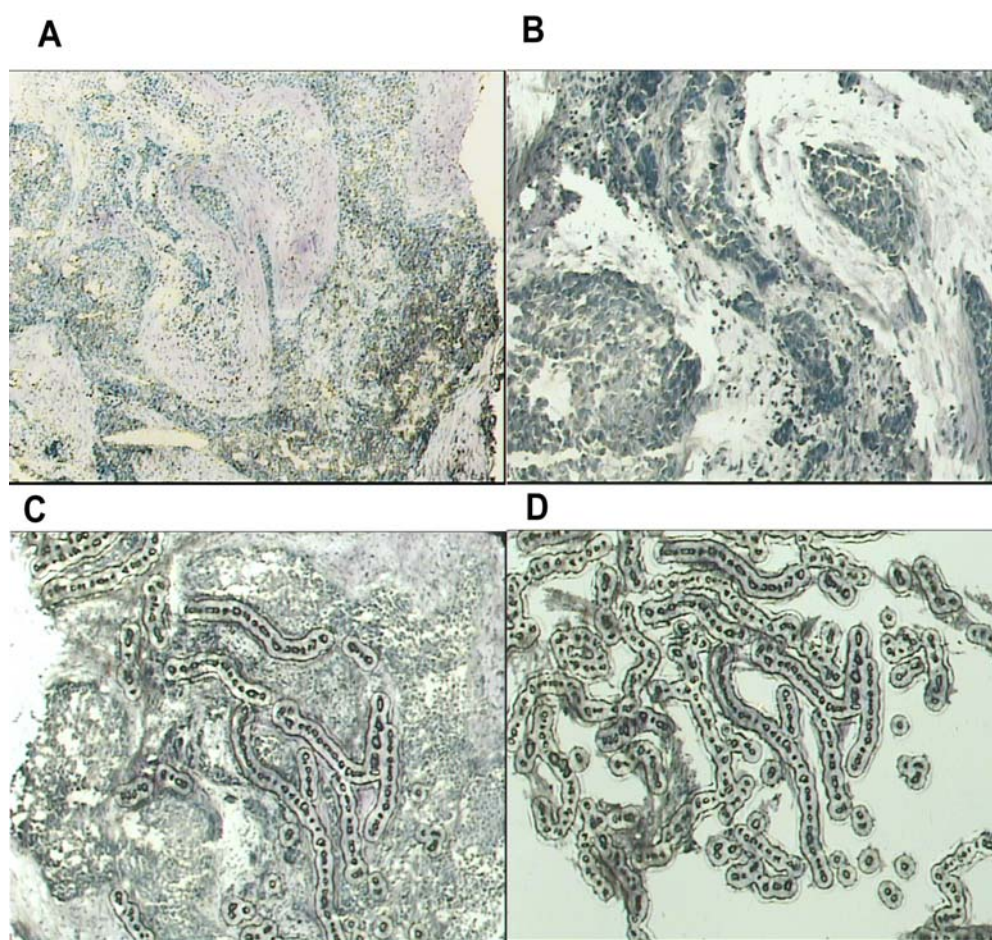


Figura 25 - Imagem recuperada do equipamento de *LCM*, do estroma enriquecido de fibroblastos do caso BC-AJ-28: A) lâmina marcada com HE antes do LCM; B) lâmina após a captura do estroma tumoral; C) imagem da região que o laser insidiu na lâmina; D) imagem do SE capturado no cap. As imagens A, C e D foram capturadas em ampliação de 200x. A imagem B foi capturada em ampliação de 400x.

4.7.2 Expressão dos mRNAs do estroma enriquecido de fibroblasto

A expressão dos mRNAs do SE foi verificada em 8 tumores das pacientes do grupo AJ e 5 tumores das pacientes do grupo MI. Após a normalização, identificamos 346 genes diferencialmente expressos com 80% ou mais de confiança. Foram encontrados 308 genes diferencialmente expressos exclusivos do estroma enriquecido com fibroblasto, ou microambiente tumoral (**Figura 26**). As vias biológicas listadas no **Quadro 11** se destacaram, revelando funções biológicas relacionadas à proliferação, diferenciação, maturação e metabolismo.

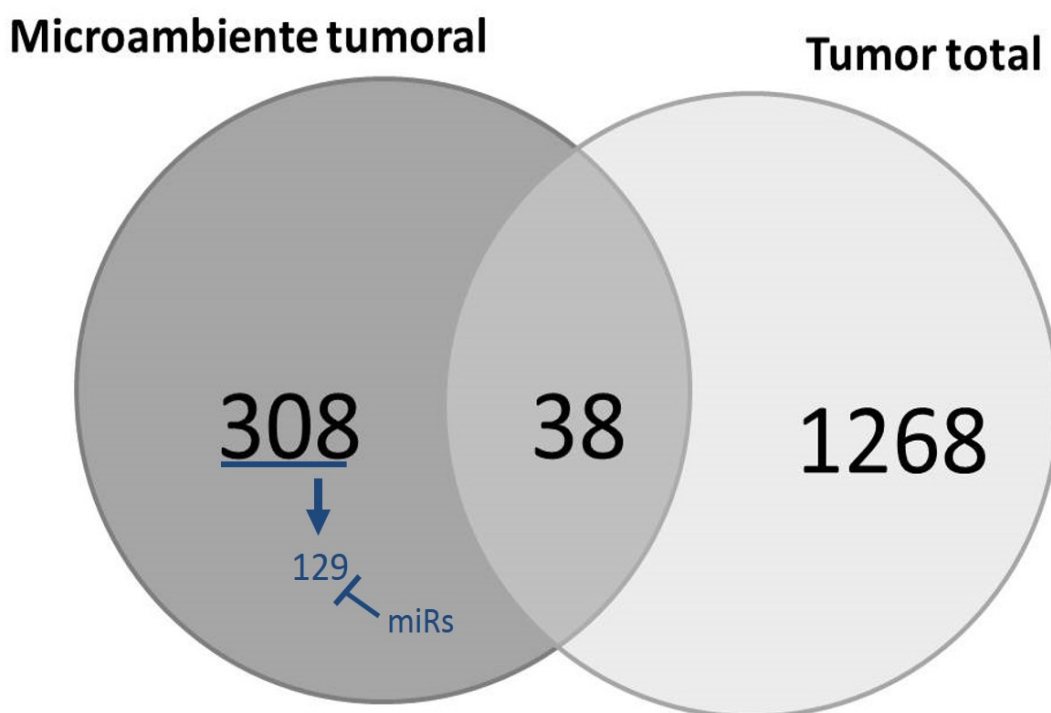


Figura 26 - Diagrama de Venn. Genes diferencialmente expressos no microambiente tumoral (cinza escuro), genes diferencialmente expressos no tumor total (cinza claro), na intersecção estão 38 genes comuns no microambiente e no tumor total, na comparação entre o grupo AJ e MI. Dentre os 308 genes exclusivos do microambiente tumoral 129 foram possivelmente regulados por pelo menos 1 miR.

Quadro 11 - Vias biológicas enriquecidas a partir dos 308 genes exclusivos do componente estromal dos grupos (AJ vs MI).

<i>Gene Symbol</i>	<i>Nome do gene</i>
Via do metabolismo (C=1130; O=14; E=7.02; R=1.99; rawP=0.0118; adjP=0.0924)	
<i>IDI2</i>	<i>isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2</i>
<i>OTC</i>	<i>ornithine carbamoyltransferase</i>
<i>POLR1D</i>	<i>polymerase (RNA) I polypeptide D 16kDa</i>
<i>FUT9</i>	<i>fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase)</i>
<i>ALG13</i>	<i>asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S. cerevisiae)</i>
<i>UQCRCQ</i>	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa</i>
<i>PIGQ</i>	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q</i>
<i>RDH16</i>	<i>retinol dehydrogenase 16 (all-trans)</i>
<i>ALDH1A3</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3</i>
<i>NDUFS5</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)</i>
<i>APIP</i>	<i>APAF1 interacting protein</i>
<i>B4GALT4</i>	<i>UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 4</i>
<i>PDHX</i>	<i>pyruvate dehydrogenase complex, component X</i>
<i>AKR1C4</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4)</i>
Via da biosíntese do Glycosfingolipidio - séries lacto e neolacto (C=26; O=2; E=0.16; R=12.38; rawP=0.0113; adjP=0.0924)	
<i>B4GALT4</i>	<i>UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 4</i>
<i>FUT9</i>	<i>fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase)</i>
Focal adhesion (C=200; O=5; E=1.24; R=4.02; rawP=0.0085; adjP=0.0924)	
<i>MAPK8</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>
<i>PAK3</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3</i>
<i>COL11A2</i>	<i>collagen, type XI, alpha 2</i>
<i>MYL5</i>	<i>myosin, light chain 5, regulatory</i>
<i>IGF1</i>	<i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>
Via do Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 (C=71; O=3; E=0.44; R=6.80; rawP=0.0099; adjP=0.0924)	
<i>GSTK1</i>	<i>glutathione S-transferase kappa 1</i>
<i>ALDH1A3</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3</i>
<i>AKR1C4</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4)</i>
Via do Câncer (C=326; O=6; E=2.03; R=2.96; rawP=0.0168; adjP=0.0987)	
<i>MAPK8</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>
<i>HSP90B1</i>	<i>heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>
<i>EGLN1</i>	<i>egl nine homolog 1 (C. elegans)</i>
<i>SHH</i>	<i>sonic hedgehog</i>
<i>GLI1</i>	<i>GLI family zinc finger 1</i>
<i>IGF1</i>	<i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>
Via de interação do receptor citocina-citocina (C=265; O=5; E=1.65; R=3.04; rawP=0.0255; adjP=0.1198)	
<i>CCL3L3</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3</i>
<i>IFNA8</i>	<i>interferon, alpha 8</i>
<i>CCL27</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 27</i>
<i>CCL18</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)</i>
<i>AMH</i>	<i>anti-Mullerian hormone</i>

Adicionalmente, a expressão de 129 genes foi alterada pela ação de pelo menos 1 dos 8 miRs, concordantes com os gene-alvos preditos (**Tabela Anexo 4**). Além disso, 87 gene-alvos seguiram a regulação direta por pelo menos um miR, 62 gene-alvos apresentaram menor expressão e seus respectivos miR apresentaram maior expressão, e 67 gene-alvos apresentaram maior expressão enquanto que os respectivos miRs apresentaram menor expressão nos tumores do grupo AJ. No entanto, 42 gene-alvos, apesar de serem alvos preditos dos miRs, não apresentaram expressão inversa ao miR, sugerindo algum outro mecanismo de regulação.

5 DISCUSSÃO

Os miRs emergiram como uma nova classe de reguladores da expressão gênica e proteica, e vem sendo muito estudados na tentativa de associar características clinicopatológicas com mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores. No entanto, devido a complexidade dos tumores mamários o papel dos miRs ainda não está claro (GUO et al. 2012; SVOBODA et al. 2012). Desta forma, investigamos a expressão de miRs e o seu papel em uma série de tumores luminais, sem mutação nos genes *BRCA1/2*, de pacientes adultas jovens e pacientes com meia idade. Visto que em um trabalho anterior do nosso grupo verificamos a prevalência deste fenótipo tumoral em pacientes brasileiras com idade ≤ 35 anos (CARRARO et al. 2013), dado contraditório a vários trabalhos na literatura relatando que tumores de pacientes europeus jovens são predominantemente triplo negativos (PARK et al. 2015). A agressividade dos tumores do subtipo triplo negativo pode ser explicada pela alta frequência de mutação nos genes *BRCA1/2*, no entanto o fenótipo luminal dos tumores geralmente não apresenta essa mutação. Assim, foram excluídas deste estudo eventuais pacientes portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2*, bem como pacientes com história familiar.

Estudos tem demonstrado que os tumores de mama desenvolvidos em pacientes adultas jovens se apresentam com estadiamento mais avançado, caracterizando tumores com fenótipo mais agressivo, em comparação aos tumores das pacientes com idade superior a 50 anos (DUTRA et al. 2009; CARRARO et al.

2013). Os resultados do presente estudo revelaram uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico e tamanho da lesão com idade jovem (**Tabela 1**). Em contraste, características como o índice mitótico e comprometimento linfonodal não foram significativamente associadas aos tumores neste grupo (idade $\leq$ 35 anos, grupo AJ). De acordo com dados da literatura o aumento do tamanho da lesão e grau mais avançado tem sido associado com o carcinoma de mama em pacientes adultas jovens (ZABICKI et al. 2006; LEE e HAN 2014). Desta forma, nosso estudo corrobora com estes resultados, sugerindo que os tumores no grupo AJ apresentam maior agressividade. A dificuldade de detecção de tumores em mama densas, comumente observadas em mulheres mais jovens, é um fato importante, e, portanto a necessidade de busca por novos marcadores para o diagnóstico, prognósticos e alvos terapêuticos (HOUSSAMI et al. 2003).

Assim como o perfil gênico, o padrão de expressão dos miRs tem sido relevante para a identificação de novos biomarcadores para o prognóstico do carcinoma de mama (GUO et al. 2012; SVOBODA et al. 2012). Nossos resultados indentificaram oito miRs diferencialmente expressos em pacientes adultas jovens com carcinoma ductal invasivo de mama (**Tabela 3**). Achados similares têm sido evidenciados por outros autores e mostram sua importância no desenvolvimento dos tumores. O presente estudo identificou o miR-106b sintetizado na região intragênica do locus 7q22. ZHENG et al. (2014) demonstraram que o miR-106b estava associado ao pior prognóstico do carcinoma de mama em mulheres com meia idade, uma vez que o aumento de expressão deste miR também foi relacionado ao tamanho dos tumores, aumento de expressão de Ki67 e metástase linfonodal. Nossos resultados também indentificou uma grande proporção de tumores com Ki67% positivo (67%)

apresentando uma super expressão de miR-106b no grupo AJ. Encontramos também uma associação estatisticamente significativa ($P = 0,02$) entre o aumento de expressão do miR-106b com o estadiamento avançado em pacientes do grupo AJ (**Tabela 4**).

Adicionalmente, nosso estudo também mostrou a presença do miR-18b neste grupo de pacientes jovens. Estudos anteriores identificaram o miR-18b, localizado no cromossomo X, desregulado em vários tipos de câncer, e especificamente em carcinoma de mama, este miR estava regulando negativamente a sinalização do ER-alfa (LEIVONEN et al. 2009). Na série estudada indicamos uma provável relação entre a diminuição de expressão de ER-alfa e aumento de expressão do miR-18b em tumores do grupo AJ (**Anexo 2**). FONSECA-SANCHEZ et al. (2013) demonstraram que a inibição do miR-18b induz a modulação de genes implicados em proliferação, apoptose, angiogênese e migração em linhagens de carcinoma de mama triplo negativa. Outro estudo indicou que a super expressão do miR-18b promoveu a proliferação e a perda de adesão celular em carcinoma hepatocelular, sugerindo este miR como potencial biomarcador preditivo e de pior prognóstico (MURAKAMI et al. 2013). Nossos resultados indicam que dentre as pacientes com tumores com Ki67 positivo, 68% apresentaram um alto nível de expressão do miR-18b (**Tabela 4**). Desta forma, o alto nível de expressão do miR-18b no carcinoma de mama em mulheres adultas jovens parece contribuir para um fenótipo mais agressivo.

O miR-372, sintetizado na região intergênica do locus 19q13, foi descrito como supressor tumoral por TIAN et al. (2011) os quais identificaram que o alto nível de expressão do miR-372 em carcinoma cervical inibiu a progressão do ciclo celular e crescimento celular. TAN et al. (2014) também identificaram o miR-372 exercendo

um papel anti-oncogênico em nasofaringe, uma vez que o alto nível de expressão do miR-372 inibiu a proliferação e o ciclo celular em linhagens celulares transfectadas. Um estudo envolvendo o carcinoma hepatocelular indicou a baixa expressão do miR-372 em comparação com tecido hepático normal, além disso, encontrou associação com o baixo nível de expressão deste miR com tumores metastáticos, sugerindo que a baixa expressão do miR-372 pode ser um biomarcador de pior prognóstico (WU et al. 2015). No entanto ainda é pouco descrito o papel do miR-372 em carcinoma de mama. Dado essas evidências, o baixo nível de expressão do miR-372 encontrado nos nossos resultados pode estar contribuindo para a agressividade dos tumores do grupo AJ. Nossos resultados indicaram que dentre as pacientes com Ki67 positivo, 80% apresentaram baixo nível de expressão do miR-372, adicionalmente foi encontrado uma associação significativa ($P= 0,001$) entre baixa expressão do miR-372 e maior tamanho do tumor (**Tabela 4**), sugerindo alta proliferação, e portanto caracterizando um fenótipo agressivo nos tumores de pacientes adultas jovens.

O miR-518a-3p é sintetizado a partir do locus 19q13, uma região intergênica. Embora pouco explorado em câncer, um estudo destacou a super expressão deste miR em carcinoma hepatocelular em comparação com o tecido normal (WANG et al. 2012). Por outro lado, QU et al. (2015) encontraram associação com o baixo nível de expressão deste miR com as características clinicopatológicas que definem um estadiamento avançado no câncer de colorretal. Sem qualquer relato prévio do miR-518a-3p em carcinoma de mama, nossos resultados indicam que o alto nível de expressão do miR-518a-3p foi associado significativamente ($P = 0,002$) com o TNM avançado dos tumores das pacientes adultas jovens (**Tabela 4**), além disso, dentre as pacientes com tumores com ki67 positivo, 77% apresentaram alto nível de expressão

do miR-518a-3p. Esses resultados sugerem o miR-518a-3p possa contribuir para o fenótipo agressivo das pacientes do grupo AJ.

Na série estudada também verificamos o miR-33b, muito investigado em desordens metabólicas como dislipidemia, colesterol e doenças hepáticas (ROTTIERS e NÄÄR 2012; RAMÍREZ et al. 2013). No câncer gástrico, este miR exerce papel regulador de genes responsáveis pela lipogênese, sugerindo uma nova estratégia de diagnóstico genético para estes casos (MIYACHI et al. 2013). FERNÁNDEZ-HERMANDO e MOORE (2011) mostraram que o aumento de expressão do miR-33b inibiu a expressão do gene codificador da proteína *protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit (AMPK)* e portanto é um regulador central de múltiplos aspectos do metabolismo lipídico, limitando o fluxo de colesterol e a degradação de ácidos graxos, mantendo a homeostase energética. Além disso, outros trabalhos sugeriram que o alto nível de expressão do miR-33b pode inibir a proliferação celular e migração celular, sugerindo um papel de supressor tumoral para o miR-33b em alguns tipos de câncer, incluindo mama (CIRERA-SALINAS et al. 2012; XU et al. 2014; LIN et al. 2015). Embora contraditório, nossos resultados indicaram uma forte relação entre o alto nível de expressão do miR-33b com tumores apresentando alto índice de proliferação uma vez que 68% dos casos apresentaram Ki67 positivo e também uma associação significativa ($P=0,016$) com maior tamanho dos tumores de pacientes do grupo AJ (**Tabela 4**). Desta maneira, nossos resultados indicaram que o alto nível de expressão do miR-33b pode contribuir para a característica agressiva dos tumores de pacientes adultas jovens.

O miR-9 maduro é sintetizado na região intergênica do locus 1q22. Este miR tem sido relatado frequentemente no carcinoma de mama, porém pouco se sabe sobre

seu papel nas pacientes com idade inferior a 35 anos. ZHOU et al. (2012) mostraram uma associação entre o aumento de expressão do miR-9 em pacientes com tumores de mama (com 50 anos de idade e a imunopositividade para ER), e recidiva e pior prognóstico, sugerindo que o miR-9 parece ser um potencial biomarcador de recorrência do carcinoma de mama. Adicionalmente a estes resultados, a alteração da expressão do miR-9 e de seus gene-alvos tem apresentado papel crucial na iniciação e progressão do carcinoma de mama primário (YANG et al. 2015). Além disso, a importância do miR-9 em carcinoma de mama também pode ser devida a sua associação com a transição epitélio mesênquima e ao fenótipo de célula tronco, evidenciando a super expressão de miR-9 com um pior prognóstico (GWAK et al. 2014). No presente estudo indentificamos uma associação estatisticamente significativa entre o aumento da expressão de miR-9 e maiores tamanhos dos tumores ($P= 0,038$) no grupo de pacientes adultas jovens. Indicamos também que dentre as pacientes com tumores com estadiamento avançado, foi observado, com significancia estatística ($P = <0,001$), o alto nível de expressão do miR-9 em 48% dos casos. Além disso, dentre as pacientes com tumor de grau nuclear 3, 75% apresentaram o alto nível de expressão do miR-9, concordando com os dados de KRELL et al. (2012) os quais descreveram a associação do alto nível de expressão de miR-9 com alto grau nuclear. Nossos resultados indicaram que dentre os tumores com alto índice de proliferação (Ki67 positivo) 76% apresentaram o alto nível de expressão do miR-9, sugerindo um fenótipo mais agressivo nos tumores das pacientes adultas jovens.

O miR-210 maduro é sintetizado na região intergênica na região 11p15. Este miR foi descrito como potencial marcador para o diagnóstico de carcinoma ductal

invasivo de mama (SUN et al. 2014). Outro estudo também destacou o miR-210 como potencial biomarcador prognóstico do carcinoma de mama uma vez que os autores revelaram, por ensaios funcionais, a associação da super expressão do miR-210 com a migração e invasão celular (ROTHÉ et al. 2011). LI et al. (2014) mostraram que o aumento de expressão deste miR estava associado com um menor tempo de sobrevida e tempo livre de doença em pacientes com carcinoma de mama. Desta forma, estas observações nos levaram a hipótese de que o aumento da expressão deste miRs parece favorecer a aquisição de características mais agressivas dos tumores no grupo de pacientes AJ, conjuntamente com nossos resultados, que indicamos que o aumento da expressão do miR-210 estava associado estatisticamente com o tamanho do tumor ($P= 0,013$). Complementarmente, dentre os tumores com Ki67 positivo, 71% (15/21) apresentaram o alto nível de expressão do miR-210 (**Tabela 4**).

Determinar o perfil de expressão dos gene-alvos tem sido essencial para elucidar estudos que buscam mecanismos de regulação por miRs. Análises de combinação de expressão do miR e seus gene-alvos também tem sido bem explorada. Assim, no presente trabalho identificamos 602 gene-alvos diferencialmente expressos na comparação entre o grupo AJ e MI e destacamos a importância do conjunto de oito genes (*ERS1*, *RPS6KA1*, *YWHAZ*, *BCL7*, *PARP12*, *DUSP2*, *DUSP8* e *PIGS*), que foram expressos especificamente nos tumores do grupo de pacientes AJ. Identificamos uma associação estatisticamente significativa entre os baixos níveis de *BCL7* e *PARP12* e o alto grau nuclear e linfonodo positivo (**Tabela 6**). Nossos resultados corroboram com dados da literatura, que identificaram genes

característicos de células imaturas com capacidade de pluripotência e controle do ciclo celular (TICHY et al. 2013).

As vias biológicas enriquecidas identificadas a partir dos 602 gene-alvos diferencialmente expressos entre os tumores do grupo AJ e MI demonstraram desregulação na proliferação, ciclo celular e crescimento tumoral. Estas observações nos levaram a sugerir que estas vias são muito significativas em carcinoma de mama em mulheres com idade menor ou igual a 35 anos, e estes mecanismos já haviam sido sugeridos anteriormente (COLLEONI et al. 2002; YAU et al. 2011). A via de sinalização de neurotrofinas é coordenada por diversos fatores neurotróficos que compreendem grandes grupos de fatores de crescimento e citocinas (interleucinas) e cujos alvos principais são os neurônios do sistema nervoso periférico e central. Os fatores de crescimento, como o BDNF, atuam via receptores de tirosina kinases e receptores de neurotrofina, e portanto, controlam a resposta apoptótica, crescimento, sobrevivência e invasão celular do sistema nervoso. No entanto, esta via não é exclusiva do tecido neural, e é potencialmente importante em tecidos derivados de células epiteliais. No presente estudo identificamos a via de neurotrofina ativada no grupo de pacientes AJ. LAGADEC et al. (2009) identificaram a expressão de receptores de neurotrofina e de tirosina kinase nos carcinomas de mama de mulheres adultas jovens, os quais provocaram a ativação da via de sinalização da MAPK estimulando a proliferação tumoral. Contrariamente, ADRIAENSSENS et al. (2008) demonstraram que a inibição destes receptores no carcinoma de mama pode provocar a diminuição do crescimento tumoral, sugerindo que BDNF (brain-derived neurotrophic factor) possa ser um potencial alvo terapêutico em modelo animal de carcinoma de mama (ADRIAENSSENS et al. 2008). Assim, esta via de sinalização

parece exercer um papel oncogênico (JIN et al. 2010) e, em contradição, um papel de supressão tumoral nos carcinoma de mama (ZHANG et al. 2014). No entanto, a ação da via de sinalização das neutrofinas em carcinoma de mama está ainda pouco conhecida. Dado essas evidências, a regulação da expressão gênica pela ação dos miRs pode alterar funções biológicas que possam estar favorecendo a agressividade dos tumores de pacientes com ≤ 35 anos de idade.

Neste trabalho destacamos a importância do conjunto de oito genes (*ERS1*, *RPS6KA1*, *YWHAZ*, *BCL7*, *PARP12*, *DUSP2*, *DUSP8* e *PIGS*) para diferenciar tumores do grupo AJ do grupo MI, sugerindo que estes sejam potenciais marcadores de agressividade uma vez que o baixo nível de expressão de *BCL7*, *PARP12* foram estatisticamente associados com alto grau nuclear e linfonodo positivo. Indicamos também uma prevalência de baixa expressão dos genes *ERS1*, *PARP12*, *RPS6KA1* e maior expressão de *DUSP8* em tumores de grau nuclear 3 em pacientes AJ (**Tabela 6**). O gene *BCL7*, localizado no cromossomo 12 e 16, foi relacionado com progressão e desenvolvimento tumoral quando encontrado pouco expresso em alguns tipos de neoplasia (POTTER et al. 2008; UEHARA et al. 2015). Os genes *DUSP2* e *DUSP8* participam na via de sinalização da MAPK, e estão relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer (KEYSE 2008). Adicionalmente o *DUSP2* tem sido relatado como um potente alvo terapêutico (WEI et al. 2013), assim como os genes da família do *PAPR12* (LEE et al. 2015). Porém, pouco se sabe sobre o gene *PIGS* no carcinoma de mama. Dado as evidências da literatura, em conjunto com nossos achados, podemos sugerir que os 8 genes podem contribuir para a agressividade dos tumores de pacientes adultas jovens.

O perfil de expressão proteico em carcinoma de mama em pacientes adultas jovens não é bem conhecido, no presente estudo encontramos 33 proteínas diferencialmente expressas entre o grupo AJ e MI. Estas proteínas foram relacionadas a funções biológicas como proliferação, ciclo celular, apoptose e neurotrofinas. Dentre o grupo de proteínas identificadas e possivelmente reguladas por miRs 20 proteínas conectavam entre si, e suas funções biológicas foram relacionadas á proliferação, apoptose e controle do ciclo celular.

Dentre as 20 proteínas interconectadas, encontramos o Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) com alto nível de expressão nos tumores do grupo AJ. Essa proteína é uma peça chave para o reparo do DNA, e que também exerce papel como fator de transcrição (SCHIEWER e KNUDSEN 2014). GREEN et al. (2015) demonstraram que a alta expressão da proteína PARP1 está relacionada com a pré-menopausa, com o tamanho do tumor, e ER positivo. Curiosamente nossos resultados também demonstraram que a proteína neuroregulina 1 (NRG1) da família do *nerve growth factor receptor* (NGFR) estava mais expressa no grupo de pacientes AJ. Esta proteína parece ser um potencial marcador adjunto para o subtipo luminal B do carcinoma de mama (TSANG et al. 2013). Outra proteína interconectada encontrada no grupo de pacientes AJ foi a proteína *signal transducer and activator of transcription 5A isoform 1* (STAT5A), que exerce papel anti-oncogênico, uma vez que controla o balanço da proliferação e diferenciação celular e a baixa expressão desta proteína apresenta-se como um fator de risco para câncer de mama (BARASH 2012). Estas evidências e em conjunto com outros dados da literatura, concluímos que a baixa expressão do STAT5A pode contribuir para a oncogênese dos tumores das pacientes do grupo AJ.

Adicionalmente, verificamos que a combinação de 8 proteínas (RAF1, BCL2L1, EIF4E, STAT5A, PARP1, ESR1, RPS6KA1 e YWHAZ) se apresentaram como classificadores, ou seja, são capazes de diferenciar entre as amostras do grupo AJ do grupo MI. Este resultado sugere que estas 8 proteínas parecem ser potenciais biomarcadores de tumores do grupo AJ (**Figura 18**). Além disso, nosso estudo observou uma associação entre os dados clinicopatológicos e a expressão destas proteínas, favorecendo a afirmação de potenciais biomarcadores, uma vez que o aumento de expressão das proteínas RAF1, PARP1 e a diminuição de expressão das proteínas STAT5, RPS6KA1 e EIF4 foram estatisticamente associados com características agressivas dos tumores do grupo AJ (**Tabela 7**). Alguns autores demonstraram que o aumento de expressão de BCL2, PARP1, RAF1 (SAMY et al. 2010; GLÉNISSON et al. 2012), e a diminuição de expressão de ESR1, EIF4E, STAT5A, RPS6KA1 (NEVALAINEN et al. 2004; ZHOU et al. 2006; CHEN et al. 2011; DAVIES e DUNN et al. 2011; REIPAS et al. 2013; YIN et al. 2014) estavam associados com o comportamento agressivo destes tumores, indicando potenciais biomarcadores preditivos desta neoplasia. Num contexto clínico, a proteína RSK1 (codificada pelo gene *RPS6KA1*) foi relatada como potencial alvo terapêutico, uma vez que os autores reduziram a proliferação celular em linhagem tumoral de mama (MCF7) in vitro em decorrência do bloqueio da expressão de RSK1 pela ação da droga (SMITH et al. 2005). A proteína *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta* (YWHAZ) ainda não foi descrita na literatura como potencial biomarcador terapêutico no carcinoma de mama.

Dado essas evidências, nossos resultados contribuem para a compreensão de mecanismos biológicos que possam promover o comportamento agressivo do

carcinoma de mama em pacientes jovens. O mecanismo biológico proposto neste estudo compreende em 7 miRs (miR-9, 18b, 33b, 106a/b, 210, 518a-3p) possivelmente atuando como oncomiRs, que foram encontrados super expressos no grupo AJ, inibindo a expressão dos genes-alvo (*ERS1*, *RPS6KA1*, *BCL7*, *PARP12*,) e as proteínas-alvo (EIF4E, STAT5A, ESR1, RPS6KA1) promovendo a carcinogênese. Assim, o miR-372 pode estar atuando como supressor de tumor, encontrado pouco expresso nos tumores do grupo AJ, permitindo possivelmente a super expressão dos genes-alvo (*YWHAZ*, *DUSP2*, *DUSP8* e *PIGS*) e proteínas-alvo (RAF1, BCL2L1, PARP1e YWHAZ) promovendo assim a carcinogênese (**Figura 27**).

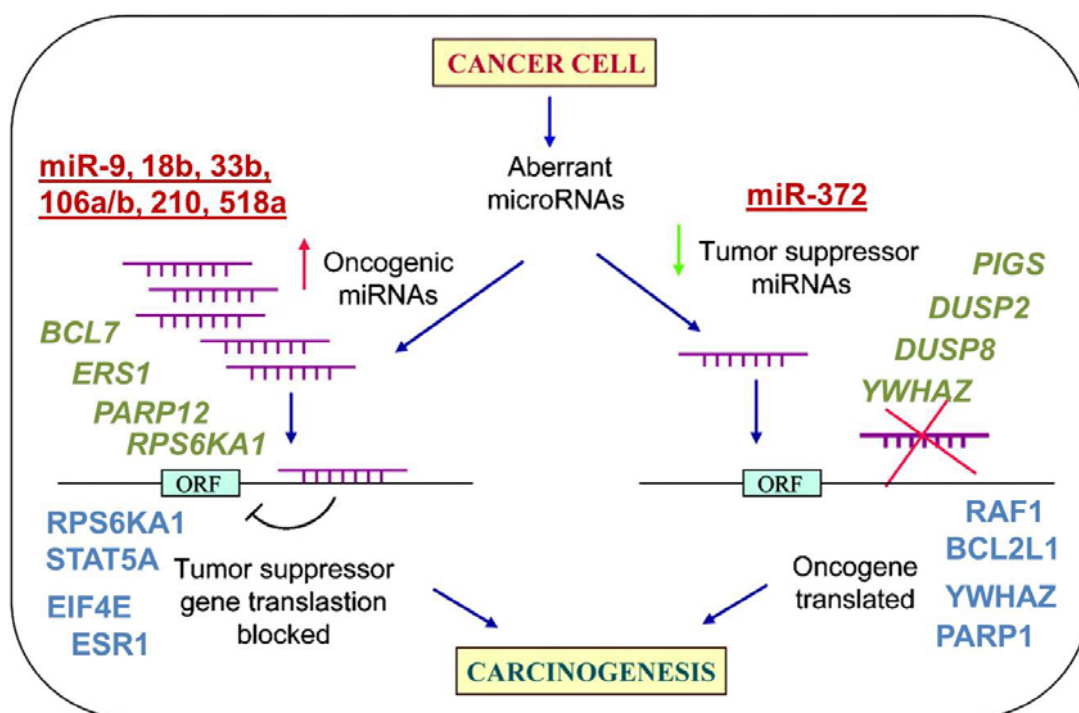


Figura 27 – Esquema do mecanismo biológico proposto neste trabalho relacionado á agressividade dos tumores de pacientes jovens com carcinoma de mama. MicroRNAs exercendo papel de oncomiR e supressor tumoral (vermelho), genes-alvos atuando como oncogenes e supressos tumoral (verde), bem como as proteínas-alvos (azul) contribuindo para a carcinogênese nas pacientes jovens.

A regulação linear dos miRs sob os níveis de expressão dos mRNA-alvos e proteína-alvos pode revelar mecanismos importantes na carcinogênese. Estudos que consiste na interação entre miR:mRNA:proteína tem contribuído para avanços prognósticos e identificação de alvos terapêuticos no carcinoma de mama (ROSTAS et al. 2014; RASHEED et al. 2015; RONDEAU et al. 2015). Porém, esta interação miR:mRNA:proteínas no carcinoma de mama em pacientes adultas jovens ainda não está claro. No presente estudo identificamos uma regulação linear entre miR-372:YWHAZ, que revelou um possível biomarcador para o carcinoma de mama em pacientes adultas jovens, uma vez que essa interação, além de ser um forte classificador do grupo de pacientes AJ, conecta-se com outras proteínas exercendo funções biológicas relacionadas a proliferação, controle do ciclo celular e apoptose. TSAI et al. (2011) também observaram esta regulação linear entre o miR-372 e os níveis de expressão de mRNA e proteína do YWHAZ em linhagem embrionária humana, e sugeriram que essa interação desempenha um papel importante na diferenciação de células embrionárias humanas durante o desenvolvimento embrionário. Nossos resultados indicaram que o aumento de expressão da proteína YWHAZ, possivelmente ocorreu devido a diminuição de expressão do miR-372 (**Quadro 8**). LEE et al. (2013) demonstraram que a proteína YWHAZ ativa sinais mitogênicos e o maquinário do ciclo celular, sugerindo que esta proteína parece exercer um papel anti-câncer. De maneira adicional, CHEN et al. (2012) indicaram que o aumento de expressão de YWHAZ estava associado ao evento de transição epitélio mesênquima (EMT) em células metastáticas pulmonares, e desta forma, parece contribuir para a malignidade tumoral (CHEN et al. 2012). Outras interações, como miR-372:RPS6KA1, miR-9:ESR1, miR-18b:ESR1, miR-33b:ESR1, miR-

106a:ESR1 e miR-106b:ESR1, também parecem ser potenciais biomarcadores para o carcinoma de mama em pacientes adultas jovens de casos esporádicos, não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2*.

A proteína *estrogen receptor* (ERS1) é um marcador clínico do carcinoma de mama, por influenciar a proliferação de células tumorais. No presente estudo, verificamos que a diminuição de expressão desta proteína estava relacionada com o aumento de expressão do miR-9. ZHOU et al. (2012) demonstraram que a associação entre miR-9 e a proteína ERS1 estava associada com o alto risco de desenvolvimento do carcinoma de mama. Adicionalmente, MADEIRA et al. (2014) demonstraram que a presença da proteína ERS1 favoreceu a transformação maligna das células mamárias. As demais interações ainda não foram descritas na literatura relacionadas ao câncer, mas parecem desempenhar um papel importante nos carcinoma de mama em pacientes adultas jovens. Assim, por meio da identificação da interação entre miR:mRNA: proteínas em tumores podemos proporcionar uma melhor compreensão das complexas redes regulatórias em carcinoma de mama ductal invasivo de pacientes adultas jovens, de casos esporádicos, não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2*.

Além do papel das interações miR:mRNA:proteína, interações entre células epiteliais tumorais e o estroma podem ativar fibroblastos normais do microambiente e estimular a formação tumoral, (KALLURI e ZEISBER 2006). Células cancerosas são capazes de induzir no estroma enzimas responsáveis pelo estresse oxidativo e transportadores monocarboxílico. Desde 1920, o efeito Warburg tem sido um princípio relevante na compreensão do desenvolvimento do câncer resultante de uma diferença da fosforilação oxidativa mitocondrial. Recentemente foi proposto um

efeito Warburg reverso, que sugere que a glicose aeróbica não ocorre na célula tumoral, mas nos fibroblastos do estroma (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al. 2014). Nossos resultados corroboram com estes achados, demonstrando que vários genes foram classificados como associados ao metabolismo após análise dos processos biológicos, incluindo principalmente enzimas tais como dehydrogenases, proteases, transferases, fosfatases e redutases (**Quadro 4**). Assim, sugerimos que os fibroblastos em pacientes adultos jovens são metabolicamente mais ativos do que os fibroblastos do microambiente de pacientes com meia idade.

Sinais bidirecionais entre células tumorais e fibroblastos associados ao câncer já foram descritos influenciando adesão e migração (ANGELUCCI et al. 2012). Outra via importante identificada na análise de estroma tumoral da nossa série, foi a via de adesão focal, que engloba os genes da família dos Rho GTPases, tais como RhoA, PAK3 (envolvidos na regulação do citoesqueleto). Durante a invasão das células tumorais, fibroblastos usam forças de contração e atividade proteolítica para reorganizar fibras de colágeno, formando rotas de migração das células neoplásicas (CONKLIN et al. 2011). Notavelmente, os membros da família GTPases, principalmente o RhoA estão implicados no remodelamento do microambiente tumoral, levando a invasão de células cancerosas (RHEE 2011). Os fibroblastos ativam a invasão dos carcinomas pelos espaços deixados na matriz pela mobilidade dos fibroblastos no microambiente tumoral. Assim, o RhoA expresso nos fibroblastos é responsável pela formação de cavidades e depósito de componentes da matriz, tais como colágeno 12-alfa1, fibronectinas e tenascina-C, que são potenciais estimuladores da invasão das células epiteliais (GAGGIOLI et al. 2007). Nosso estudo mostrou uma desregulação dos genes do RhoA e COL12A1 nos tumores do

grupo AJ sugerindo uma maior capacidade de invasão das células epiteliais no microambiente tumoral.

Outra via indicada pela expressão dos genes, exclusivos dos fibroblastos neste estudo, foi a via do citocromo P450. O citocromo P450 é uma heme-proteína responsável pela catálise de uma série de reações levando à formação do anel fenólico característico dos estrógenos a partir de precursores androgênico. Nas pacientes do grupo MI, verificamos o gene *E2*, responsável pela codificação de uma heme-proteína, que é produzida por regiões extragonadais (ossos, vasos, cérebro), onde a ação da aromatasas pode gerar E2 sítio-específico. Vários genes expressos em tumores do grupo AJ foram associados à função biológica de maturação celular. Assim, a presença de P450 em fibroblastos mamários indica que estes podem produzir estrógeno. Várias pesquisas indicaram a presença de receptores de estrógeno alfa em fibroblastos (SUDA et al. 2012; KNOWER et al. 2013). De acordo com KOERNER et al. (2001), tecidos de adolescentes contém um maior número de fibroblastos ER positivos e resultados em ratas indicam um papel crítico do ER em fibroblastos na morfogênese e crescimento dos ductos mamários.

No presente estudo também identificamos genes responsáveis pela diferenciação celular, como o gene *PR domain containing 10 (PRDM10)*, que apresentou aumento de expressão nos tumores do grupo AJ. PARK e KIM (2010) demonstraram um aumento de expressão deste gene no sistema nervoso embrionário em ratos. Estudos recentes tem mostrado este gene *PRDM10* em células indiferenciadas de sarcomas (HOFVANDER et al. 2015). Desta forma, tais evidências indicam que os fibroblastos possam exercer um papel importante no desenvolvimento da mama em pacientes adultas jovens, corroborando com os

achados de TICHY et al. (2013) que mostraram a expressão de genes associados à população de células mamárias imaturas em tumores de pacientes adultas jovens. Além disso, nosso trabalho também identificou a diminuição de expressão do gene *Klotho* (*KL*). WOLF et al. (2008) relatou a influência deste gene no processo de proliferação e apoptose em carcinoma de mama. Assim, nossos resultados indicam um papel do gene *KL* como supressor de tumor em carcinoma de mama, sugerindo que a diminuição da expressão deste gene nos tumores do grupo AJ pode influenciar na aquisição de características agressivas destes tumores. Já o gene *ALDH1A3* associado a vias do metabolismo e à ação xenobiótica do citocromo 450, na serie estudada se apresentou com um aumento de expressão nos tumores do grupo AJ. Este gene está relacionado á oxidação de aldeídos gerados pelo metabolismo de aminoácidos, gordura, alimento, fumo, aditivos e drogas xenobióticas (usualmente para tratamento do câncer - cyclofosfamida). A inibição seletiva da proteína *ALDH1A3* pela ação da droga cyclofosfamida pode aumentar a quimiossensibilidade utilizando esta droga em tumores que expressas *ALDH1A3*, como células mesenquimais do glioblastoma. Adicionalmente, os fibroblastos do pulmão que expressam *ALDH1A3* não são sensibilizados pela ação da droga (PARAJULI et al. 2014).

Em conclusão, as diferenças dos perfis de expressão de miRs, genes e proteínas entre tumores de pacientes adultas jovens e de meia idade sugerem características moleculares associadas a agressividade sendo o miR-9, miR-18b, miR-33b, miR-106a, miR-106b, miR-210, miR-372 e miR-518a-3p os possíveis reguladores de funções biológicas relacionadas à proliferação, ciclo celular, desenvolvimento e metabolismo neste grupo amostral. O perfil de expressão dos miRs, mRNA e

proteínas nos tumores de pacientes adultas jovens caracterizam uma entidade única e específica, independente dos subtipos, que caracterizam tumores mais agressivos quando comparados com os tumores de pacientes com idade entre 50-65 anos. Dentre os alvos regulados diretamente pelo miR, ressaltamos os genes *ESR1*, *RPS6KA1*, *YWHAZ*, *BCL7*, *PARP12*, *DUSP2*, *DUSP8* e *PIGS*, bem como as proteínas RAF1, BCL2L1, EIF4E, STAT5A, PARP1, ESR1, RPS6KA1 e YWHAZ como classificadores do grupo AJ, e parecem ser potenciais biomarcadores de agressividade dos tumores nestas pacientes. O microambiente tumoral também parece influenciar as células epiteliais tumorais das pacientes adultas jovens devido à ativação de um conjunto de genes exclusivos do estroma tumoral enriquecido de fibroblastos, que exercem funções relacionadas a proliferação, maturação e metabolismos, de modo a contribuir a aquisição de características agressivas destes tumores. No cenário clínico os perfis de expressão dos miRs, mRNAs e proteínas podem representar uma ferramenta adicional para estabelecer o prognóstico no grupo de pacientes que desenvolvem carcinoma de mama em idade jovem.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluimos que:

- 1 Foram encontrados 8 miRs (miR-9; 18b; 33b; 106a; 106b; 210; 518a-3p e miR-372), 602 gene-alvos e 33 proteínas diferencialmente expressos nos tumores das pacientes com ≤ 35 anos quando comparados com os tumores de pacientes com idade entre 60-65 anos; Os miR-9, 33b 106b 210, 518a-3p e miR-372- foram associados ao estadiamento avançado e tumores maiores que 2 cm. Adicionalmente 24 proteina-alvos possivelmente reguladas direta e/ou indiretamente por pelo menos 1 dos 8 miRs em carcinoma de mama em adultas jovens.
- 2 As análises *in silico* dos gene-alvos e proteínas diferencialmente expressos resultaram em funções biológicas relacionadas à proliferação, ciclo celular, apoptose e desenvolvimento que podem estar alteradas nos tumores de mama do grupo AJ em comparação com o grupo MI.
- 3 A análise de interações resultou nas proteínas ESR1, RPS6KA1, YWHAZ cujos os níveis de mRNA dos mesmos foram alterados concordantemente, possivelmente regulados pelo miR, sugerindo possíveis biomarcadores do carcinoma de mama em mulheres jovens, de caso esporádico, não portadores de mutação nos genes *BRCA/2*.
- 4 A validação da proteína RSK1 por imunohistoquímica foi concordante com os dados do RPPA, onde o grupo AJ apresentou fraca marcação de RSK1 em comparação com a forte marcação dos tumores do grupo MI.

- 5 O estroma tumoral enriquecido de fibroblastos, pelo método de LCM, resultou em 308 genes diferencialmente expressos nos tumores de pacientes AJ em comparação com os tumores do grupo MI, sendo 129 gene-alvos possivelmente regulados por pelo menos 1 dos 8 miRs encontrados neste estudo.

7 COMENTÁRIOS

Este trabalho foi apresentado em forma de pôster nos congressos: *Keystone Symposia* sobre “PI3K signaling Pathways in Disease” no período de 13 a 18 de Janeiro de 2015 e *Gordon Research Conference* sobre “Cancer and Epigenetics” no período do dia 12 a 17 de Abril de 2015 (**Anexos 5 e 6**).

8 PERSPECTIVAS

Realizar a validação por imunohistoquímica de proteínas com potencial papel de biomarcador de agressividade do carcinoma de mama em adultas jovens. E submeter o artigo do **Anexo 8** na revista PloSOne.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well characterized series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer** 2005; 116:340-50.

Adachi R, Horiuchi S, Sakurazawa Y, Hasegawa T, Sato K, Sakamaki T. ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 411:804-8.

Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. **Cancer Res** 2008; 68:346-51.

Alvarenga AW, Coutinho-Camillo CM, Rodrigues BR, et al. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. **J Histochem Cytochem** 2013; 61:272-82.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. **Nature** 2004; 431:350-5.

Anders CK, Acharya CR, Hsu DS, et al. Age-specific differences in oncogenic pathway deregulation seen in human breast tumors. **PLoS ONE** 2008a; 3:e1373.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. **J Clin Oncol** 2008b; 26:3324-30.

Anders CK, Fan C, Parker JS, et al. Breast carcinomas arising at a young age: unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? **J Clin Oncol** 2011; 29:e18-20.

Angelucci C, Maulucci G, Lama G, et al. Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. **PLoS One** 2012; 7:e50804.

Aprelikova O, Yu X, Palla J, et al. The role of miR-31 and its target gene SATB2 in cancer-associated Wbroblasts. **Cell Cycle** 2010; 9:4387-98.

Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. **Clin Cancer Res** 2012; 18:1341-51.

Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008; 455:64-71.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001; 19:3622-34.

Barash I. Stat5 in breast cancer: potential oncogenic activity coincides with positive prognosis for the disease. **Carcinogenesis** 2012; 33:2320-5.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** 2009; 136:215-33.

Bastos EP, Brentani H, Pasini FS, et al. MicroRNAs discriminate familial from sporadic non-BRCA1/2 breast carcinoma arising in patients ≤ 35 years. **PLoS One** 2014; 9:e101656.

Beadle BM, Woodward WA, Tucker SL, et al. Ten-year recurrence rates in young women with breast cancer by locoregional treatment approach. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2009; 73:734-44.

Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation** 2002; 70:537-46.

Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. **Genome Biol** 2007; 8:R214.

Bockmeyer CL, Christgen M, Müller M, et al. MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 130:735-45.

BreastCancerTreatment.in. **Ductal breast cancer in situ (DCIS)**. Available form: <URL://http://www.breastcancertreatment.in/ductal_breast_cancer1.htm> [2015 fev 15]

Brentani H, Nakano EY, Martins CB, Izbicki R, Pereira CA. Disequilibrium coefficient: a bayesian perspective. **Statist Appl Genet Mol Biol** 2011; 10:1-22.

Brinton LA, Sherman ME, Carreon JD, Anderson WF. Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:1643-8.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem** 2009; 55:611-22.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA** 2006; 295:2492-502.

Castro NP, Osório CA, Torres C, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R87.

Carraro DM, Koike Folgueira MA, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One** 2013; 8:e57581.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:736-50.

Cheng C, Fu X, Alves P, Gerstein M. mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. **Genome Biol** 2009; 10:R90.

Chen Y, Chen C, Yang B, et al. Estrogen receptor-related genes as an important panel of predictors for breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. **Cancer Lett** 2011; 302:63-8.

Chen CH, Chuang SM, Yang MF, Liao JW, Yu SL, Chen JJ. A novel function of YWHAZ/ β -catenin axis in promoting epithelial-mesenchymal transition and lung cancer metastasis. **Mol Cancer Res** 2012; 10:1319-31.

Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. **Genes Dev** 2010; 24:992-1009.

Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, et al. Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression. **Cell Cycle** 2012; 11:922-33.

Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. **Ann Oncol** 2002; 13:273-9.

Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. **Am J Pathol** 2011; 178:1221-32.

Davies AH, Dunn SE. YB-1 drives preneoplastic progression: Insight into opportunities for cancer prevention. **Oncotarget** 2011; 2:401-6.

De Campos CP, Pereira CAB, Paola MV. **Quor: Ordering quantiles through confidence statements**. December 30 2014. <URL:<http://http://cran.r-project.org/web/packages/Quor/vignettes/Quor.pdf>> [2015 jan 12]

de Juan Jiménez I, Esteban Cardenosa E, Palanca Suela S, et al. Low prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in the sporadic breast cancer of Spanish population. **Fam Cancer** 2012; 11:49-56.

de Sanjosé S, Léoné M, Bérez V, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. **Int J Cancer** 2003; 106:588-93.

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. **Science** 1987; 14:178-82.

Dutra MC, Rezende MA, de Andrade VP, et al. Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2009; 31:54-60.

Dweep H1, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes. **J Biomed Inform** 2011; 44:839-47.

El Saghir NS, Khalil MK, Eid T, et al. Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab countries: a literature and registry analysis. **Int J Surg** 2007; 5:225-33.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow up. **Histopathology** 1991; 19:403-10.

[FOSP] Fundação Oncentro de São Paulo. **Informações epidemiológicas: tabulação de dados dos exames citológicos.** <URL:<http://200.144.1.68/cgi-bin/dh?patologia/TabCitc.def>> [2014 set 12]

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression based predictors for breast cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:560-6.

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Nat Med** 2009; 15:68-74.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase n° 11.** 2013. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year> [2015 jan 12].

Fernández-Hernando C, Moore KJ. MicroRNA modulation of cholesterol homeostasis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2011; 31:2378-82.

Fernandopulle SM, Cher-Siangang P, Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. **Pathology** 2006; 38:219-22.

Fiegl H, Millinger S, Goebel G, et al. Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. **Cancer Res** 2006; 66:29-33.

Finak G, Bertos N, Pepin F, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. **Nat Med** 2008; 14:518-27.

Fonseca-Sánchez MA, Pérez-Plasencia C, Fernández-Retana J, et al. microRNA-18b is upregulated in breast cancer and modulates genes involved in cell migration. **Oncol Rep** 2013; 30:2399-410.

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

Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Semin Cell Dev Biol** 2010; 21:33-9.

Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. **PLoS One** 2009; 4:e7695.

Gabriel CA, Domchek SM. Breast cancer in young women. **Breast Cancer Res** 2010; 12:212.

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. **Nat Cell Biol** 2007; 9:1392-400.

Gaidatzis D, van Nimwegen E, Hausser J, et al. Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. **BMC Bioinformatics** 2007; 8:69-79.

Glénisson M, Vacher S, Callens C, et al. Identification of new candidate therapeutic target genes in triple-negative breast cancer. **Genes Cancer** 2012; 3:63-70.

Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, et al. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. **Cancer** 2005; 103:2466-72.

Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, et al. Functional proteomics can define prognosis and predict pathologic complete response in patients with breast cancer. **Clin Proteomics** 2011; 8:11.

Gonzalez-Angulo AM, Liu S, Chen H, Chavez-Macgregor M, Sahin A, Hortobagyi GN, Mills GB, Do KA, Meric-Bernstam F. Functional proteomics characterization of residual breast cancer after neoadjuvant systemic chemotherapy. **Ann Oncol** 2013; 24:909-16.

Green AR, Caracappa D, Benhasouna AA, et al. Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 149:353-62.

Guo L, Zhao Y, Yang S, Cai M, Wu Q, Chen F. Genome-wide screen for aberrantly expressed miRNAs reveals miRNA profile signature in breast cancer. **Mol Biol Rep** 2013; 40:2175-86.

Gwak JM, Kim HJ, Kim EJ, et al. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 147:39-49.

Han W, Kang SY, Korean Breast Cancer Society. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 119:193-200.

Hayashi N, Manyam GC, Gonzalez-Angulo AM, et al. Reverse-phase protein array for prediction of patients at low risk of developing bone metastasis from breast cancer. **Oncologist** 2014; 19:909-14.

Hedenfalk I, Ringner M, Ben-Dor A, et al. Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:2532-7.

Hennessy BT, Lu Y, Gonzalez-Angulo AM, et al. A technical assessment of the utility of reverse phase protein arrays for the study of the functional proteome in non-microdissected human breast cancers. **Clin Proteomics** 2010; 6:129-51.

Hoffman AE, Zheng T, Yi C, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. **Cancer Res** 2009; 69:5970-7.

Hofvander J, Tayebwa J, Nilsson J, et al. Recurrent PRDM10 gene fusions in undifferentiated pleomorphic sarcoma. **Clin Cancer Res** 2015; 21:864-9.

Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. **Mod Pathol** 2005; 18:1305-20.

Horny HP, Marx L, Kröber S, Lüttges J, Kaiserling E, Dietl J. Granulosa cell tumor of the ovary: immunohistochemical evidence of low proliferative activity and virtual absence of mutation of the p53 tumor-suppressor gene. **Gynecol Obstet Invest** 1999; 47:133-8.

Houssami N, Irwig L, Simpson JM, McKessar M, Blome S, Noakes J. Sydney Breast Imaging Accuracy Study: Comparative sensitivity and specificity of mammography and sonography in young women with symptoms. **AJR Am J Roentgenol** 2003; 180:935-40.

Howe EN, Cochrane DR, Richer JK. The miR-200 and miR-221/222 microRNA families: opposing effects on epithelial identity. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2012; 17:65-77.

Hu W, Meng X, Lu T, et al. MicroRNA 1 inhibits the proliferation of Chinese sika deer derived cartilage cells by binding to the 3'-untranslated region of IGF 1. **Mol Med Rep** 2013; 8:523-8.

Huang GL, Zhang XH, Guo GL, et al. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. **Oncol Rep** 2009; 21:673-9.

Huang V, Place RF, Portnoy V, et al. Upregulation of cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. **Nucleic Acids Res** 2012; 40:1695-707.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res** 2005; 65:7065-70.

Jayaswal V, Lutherborrow M, Ma DD, Yang YH. Identification of microRNA-mRNA modules using microarray data. **BMC Genomics** 2011; 12:138.

Jin W, Kim GM, Kim MS, et al. TrkC plays an essential role in breast tumor growth and metastasis. **Carcinogenesis** 2010; 31:1939-47.

Johnson RH, Chien FL, Bleyer A. Incidence of breast cancer with distant involvement among women in the United States 1976 to 2009. **JAMA** 2013; 309:800-5.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblast in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:392-401.

Keegan TH, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R55.

Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2008; 27:253-61.

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol** 2008; 44:509-17.

Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, et al. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. **J Clin Oncol** 2006; 24:5091-7.

Knower KC, Chand AL, Eriksson N, et al. Distinct nuclear receptor expression in stroma adjacent to breast tumors. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 14:211-23.

Koerner F, Oyama T, Kurosumi M, Maluf H. Ovarian hormone receptors in human mammary stromal cells. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2001; 78:285-90.

Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. **Oncogene** 2009; 28:1960-70.

Krell J, Frampton AE, Jacob J, et al. The clinico-pathologic role of microRNAs miR-9 and miR-151-5p in breast cancer metastasis. **Mol Diagn Ther** 2012; 16:167-72.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 2001; 294:858-62.

Lee AJ, Cunningham AP, Kuchenbaecker KB, et al. BOADICEA breast cancer risk prediction model: updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface. **Br J Cancer** 2014; 110:535-45.

Lee CG, Park GY, Han YK, et al. Roles of 14-3-3 η in mitotic progression and its potential use as a therapeutic target for cancers. **Oncogene** 2013; 32:1560-9.

Lee HB, Han W. Unique features of young age breast cancer and its management. **J Breast Cancer** 2014; 17:301-7.

Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic implications of microRNA-21 overexpression in invasive ductal carcinomas of the breast. **J Breast Cancer** 2011; 14:269-75.

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

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **EMBO J** 2002; 21:4663-70.

Lee YH, Liu X, Qiu F, O'Connor TR, Yen Y, Ann DK. HP1 β is a biomarker for breast cancer prognosis and PARP inhibitor therapy. **PLoS One** 2015; 10:e0121207.

Leivonen SK, Mäkelä R, Ostling P, et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. **Oncogene** 2009; 28:3926-36.

Leivonen SK, Sahlberg KK, Mäkelä R, et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. **Mol Oncol** 2014; 8:93-104.

Li M, Ma X, Li M, et al. Prognostic role of microRNA-210 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. **Dis Markers** 2014; 2014:106197.

Li Z, Sae-Lim V. Comparison of acidic fibroblast growth factor on collagen carrier with calcium hydroxide as pulp capping agents in monkeys. **Dent Traumatol** 2007; 23:278-86.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature** 2005; 433:769-73.

Lin Y, Liu AY, Fan C, et al. MicroRNA-33b Inhibits breast cancer metastasis by targeting HMGA2, SALL4 and Twist1. **Sci Rep** 2015; 5:9995.

Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. **N Engl J Med** 2007; 356:217-26.

Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1215-23.

Madeira KP, Daltoé RD, Sirtoli GM, Carvalho AA, Rangel LB, Silva IV. Estrogen receptor alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are risk biomarkers for breast cancer development. **Mol Biol Rep** 2014; 41:5459-66.

Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. **JAMA** 1998; 279:922-9.

Marques PC, Pereira CA. Predictive analysis of microarray data. **Open J Genet** 2014; 4:63-8.

Mack GS. MicroRNA gets down to business. **Nat Biotechnol** 2007; 25:631-8.

Malinowsky K, Raychaudhuri M, Buchner T, et al. Common protein biomarkers assessed by reverse phase protein arrays show considerable intratumoral heterogeneity in breast cancer tissues. **PLoS One** 2012; 7:e40285.

Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. **Semin Oncol** 2014; 41:195-216.

Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. **FEBS Lett** 2011; 585:2087-99.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

miRBase. **miRBase: the microRNA database**. July 3, 2014. Available from: <URL:<http://www.mirbase.org>> [2014 out 12]

Miyachi K, Sawada Y, Shida Y, Sugawara A, Hisatomi H. Lipogenic gene expression profile in patients with gastric cancer. **Mol Clin Oncol** 2013; 1:825-7.

Mueller MM1, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:839-49.

Murakami Y, Tamori A, Itami S, et al. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. **BMC Cancer** 2013; 13:99.

Nakhliis F, Morrow M. Ductal carcinoma in situ. **Surg Clin North Am** 2003; 83:821-39.

Nassar FJ, El Sabban M, Zgheib NK, et al. miRNA as potential biomarkers of breast cancer in the Lebanese population and in young women: a pilot study. **PLoS One** 2014; 9:e107566.

Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 121:575-89.

Nevalainen MT, Xie J, Torhorst J, et al. Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. **J Clin Oncol** 2004; 22:2053-60.

Ng EK, Li R, Shin VY, Siu JM, Ma ES, Kwong A. MicroRNA-143 is downregulated in breast cancer and regulates DNA methyltransferases 3A in breast cancer cells. **Tumour Biol** 2014; 35:2591-8.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5367-74.

Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. **Cell Cycle** 2006; 5:1597-601.

Ortega Jacome GP, Koifman RJ, Rego Monteiro GT, Koifman S. Environmental exposure and breast cancer among young women in Rio de Janeiro, Brazil. **J Toxicol Environ Health A** 2010; 73:858-65

Ozgün A, Karagoz B, Bilgi O, Tuncel T, Baloglu H, Kandemir EG. MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer. **Onkologie** 2013; 36:115-8.

Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. **Genes Dev** 2008; 22:3172-83.

Pan F, Mao H, Deng L, Li G, Geng P. Prognostic and clinicopathological significance of microRNA-21 overexpression in breast cancer: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:5622-33.

Parajuli B, Georgiadis TM, Fishel ML, Hurley TD. Development of selective inhibitors for human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1) for the enhancement of cyclophosphamide cytotoxicity. **Chembiochem** 2014; 15:701-12.

Park JA, Kim KC. Expression patterns of PRDM10 during mouse embryonic development. **BMB Rep** 2010; 43:29-33.

Park YH, Lee SJ, Jung HA, et al. Prevalence and clinical outcomes of young breast cancer (YBC) patients according to intrinsic breast cancer subtypes: single institutional experience in Korea. **Breast** 2015 Feb 23. [Epub ahead of print]

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One** 2011; 6:e17063.

Peña-Chilet M, Martínez MT, Pérez-Fidalgo JA, et al. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. **BMC Cancer** 2014; 14:529.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature** 2000; 406:747-52.

Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. **Front Genet** 2014; 5:23.

Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. **PLoS Med** 2008; 5:e19.

Polyak K, Kalluri R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a003244.

Potter N, Karakoula A, Phipps KP, et al. Genomic deletions correlate with underexpression of novel candidate genes at six loci in pediatric pilocytic astrocytoma. **Neoplasia** 2008; 10:757-72.

Qian B, Katsaros D, Lu L, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 117:131-40.

Qiu W, Hu M, Sridhar A, et al. No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. **Nat Genet** 2008; 40:650-5.

Qu LL, He L, Zhao X, Xu W. Downregulation of miR-518a-3p activates the NIK-dependent NF- κ B pathway in colorectal cancer. **Int J Mol Med** 2015; 35:1266-72.

R Development Core Team. **R Foundation for Statistical Computing** 2008. Available from: <URL:<http://www.r-project.org>> [2015 jan 12]

Raghav KP, Wang W, Liu S, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes. **Clin Cancer Res** 2012; 18:2269-77.

Ramírez CM, Goedeke L, Rotllan N, et al. MicroRNA 33 regulates glucose metabolism. **Mol Cell Biol** 2013; 33:2891-902.

Rasheed SA, Teo CR, Beillard EJ, et al. MicroRNA-31 controls G protein alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion in breast cancer cells. **Mol Cancer** 2015; 14:67.

Reipas KM, Law JH, Couto N, et al. Luteolin is a novel p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor that suppresses Notch4 signaling by blocking the activation of Y-box binding protein-1 (YB-1). **Oncotarget** 2013; 4:329-45.

Ricarte-Filho JC, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, da Silva MJ, Kimura ET. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. **Transl Oncol** 2009; 2:236-41.

Rondeau S, Vacher S, De Koning L, et al. ATM has a major role in the double-strand break repair pathway dysregulation in sporadic breast carcinomas and is an independent prognostic marker at both mRNA and protein levels. **Br J Cancer** 2015; 112:1059-66.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **Oncologist** 2009; 14:320-68.

Rostas JW 3rd, Pruitt HC, Metge BJ, et al. microRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. **Mol Cancer** 2014; 13:200.

Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2012; 13:239-50.

Rothé F, Ignatiadis M, Chaboteaux C, et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. **PLoS One** 2011; 6:e20980.

Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, et al. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. **Int J Cancer** 2009; 125:2767-77.

Salehi F, Turner MC. Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorides as potential endocrine disruptors. **J Toxicol Environm Health** 2008; 11:276-300.

Samy N, Ragab HM, El Maksoud NA, Shaalan M. Prognostic significance of serum Her2/neu, BCL2, CA15-3 and CEA in breast cancer patients: a short follow-up. **Cancer Biomark** 2010; 6:63-72.

Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. **FEBS J** 2011; 278:1598-609.

Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature** 2008; 455:58-63.

Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer: The South Australian Breast Cancer Study Group. **J Clin Oncol** 1993; 14:1936-42.

Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. **Mol Cancer Res** 2014; 12:1069-80.

Shen Z, Chen L, Yang X, et al. Downregulation of Ezh2 methyltransferase by FOXP3: new insight of FOXP3 into chromatin remodeling? **Biochim Biophys Acta** 2013; 1833:2190-200.

Silveri L, Tilly G, Vilotte JL, Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. **Reprod Nutr** 2006; 46:549-56.

Shukla K, Sharma AK, Ward A, et al. MicroRNA-30c-2-3p negatively regulates NF- κ B signaling and cell cycle progression through downregulation of TRADD and CCNE1 in breast cancer. **Mol Oncol** 2015; 9:1106-19.

Smart CR, Byrne C, Smith RA, et al. Twenty-year follow-up of the breast cancers diagnosed during the Breast Cancer Detection Demonstration Project. **CA Cancer J Clin** 1997, 47:134-49.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. **Cancer Res** 2005; 65:1027-34.

Schnitt SJ. Normal anatomy and development. In: Hayes DF, editor. **Atlas of breast cancer**. London: Mosby; 1995. p.3.2-3.4.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:10393-8.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:8418-23.

Stiepcich MMA. **Perfil de citoceratinas e sua relação com diferenciação e fatores clínicomorfológicos em carcinomas ductais soe de mama estudados em “array de tecido” (tissue microarray – TMA)**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Svoboda M, Sana J, Fabian P, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. **Radiat Oncol** 2012; 7:195.

Suda T, Oba H, Takei H, Kurosumi M, Hayashi S, Yamaguchi Y. ER-activating ability of breast cancer stromal fibroblasts is regulated independently of alteration of TP53 and PTEN tumor suppressor genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428:259-63.

Sun EH, Zhou Q, Liu KS, et al. Screening miRNAs related to different subtypes of breast cancer with miRNAs microarray. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18:2783-8.

Tabchy A, Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Bernstam FM, Lu Y, Mills GB. Quantitative proteomic analysis in breast cancer. *Drugs Today (Barc)* 2011; 47:169-82.

Tan JK, Tan EL, Gan SY. Elucidating the roles of miR-372 in cell proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma TW01 cells. *Exp Oncol* 2014; 36:170-3.

Tan PH, Jayabaskar T, Yip G, et al. p53 and c-kit (CD117) protein expression as prognostic indicators in breast phyllodes tumors: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005; 18:1527-34.

The Cancer Council Victoria. **Breast health**. Available from: <URL:<http://www.cancervic.org.au/preventing-cancer/attend-screening/breasts-health>> [2005 ago 12].

Theriault RL, Carlson RW, Allred C, et al. Breast cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11:753-60.

Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, et al. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *J Biol Chem* 2011; 286:25556-63.

Tichy JR, Lim E, Anders CK. Breast cancer in adolescents and young adults: a review with a focus on biology. **J Natl Compr Canc Netw** 2013; 11:1060-9.

Tricoli JV1, Seibel NL, Blair DG, et al. Unique characteristics of adolescent and young adult acute lymphoblastic leukemia, breast cancer, and colon cancer. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103:628-35.

Tsang JY, Wong KH, Lai MW, et al. Nerve growth factor receptor (NGFR): a potential marker for specific molecular subtypes of breast cancer. **J Clin Pathol** 2013; 66:291-6.

Tsai ZY, Chou CH, Lu CY, Singh S, Yu SL, Li SS. Proteomic comparison of human embryonic stem cells with their differentiated fibroblasts: Identification of 206 genes targeted by hES cell-specific microRNAs. Kaohsiung **J Med Sci** 2011; 27:299-306.

Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene** 2007; 26:2126-32.

Uehara T, Kage-Nakadai E, Yoshina S, Imae R, Mitani S. The Tumor Suppressor BCL7B Functions in the Wnt Signaling Pathway. **PLoS Genet** 2015; 11:e1004921.

Uhrhammer N, Abdelouahab A, Lafarge L, Feillel V, Ben Dib A, Bignon YJ. BRCA1 mutations in Algerian breast cancer patients: high frequency in young, sporadic cases. **Int J Med Sci** 2008; 5:197-202.

van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **Am J Pathol** 2002; 161:1991-6.

Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. **Cell** 2009; 137:1032-46.

Xiong Q, Valero V, Kau V, et al. Female patients with breast carcinoma age 30 years and younger have a poor prognosis: the M.D. Anderson Cancer Center experience. **Cancer** 2001; 92:2523-8.

Xu N, Li Z, Yu Z, et al. MicroRNA-33b suppresses migration and invasion by targeting c-Myc in osteosarcoma cells. **PLoS One** 2014; 9:e115300.

Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. **Nucleic Acids Res** 2013; 41:W77-83.

Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol** 2012; 18:5442-53.

Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. **Br J Cancer** 1996; 74:1796-800.

Wei W, Jiao Y, Postlethwaite A, et al. Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases. **Genes Immun** 2013; 14:1-6.

Wennmalm K, Ostman A, Bergh J. Stromal signature identifies basal breast cancers. **Nat Med** 2009; 15:237-8.

Wong EM, Southey MC, Fox SB, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. **Cancer Prev Res (Phila)** 2011; 4:23-33.

Wu G, Wang Y, Lu X, et al. Low mir-372 expression correlates with poor prognosis and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer** 2015; 15:182.

Yang Y, Xing Y, Liang C, Hu L, Xu F, Chen Y. Crucial microRNAs and genes of human primary breast cancer explored by microRNA-mRNA integrated analysis. **Tumour Biol** 2015 Feb 14. [Epub ahead of print]

Yankaskas BC. Epidemiology of breast cancer in young women. **Breast Dis** 2005-2006; 23:3-8.

Zabicki K, Colbert JA, Dominguez FJ, et al. Breast cancer diagnosis in women ≤ 40 versus 50 to 60 years: increasing size and stage disparity compared with older women over time. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:1072-7.

Zhang B, Kirov SA, Snoddy JR. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:W741-748.

Zhang W, Lin ZC, Zhang TX, et al. TrkC expression predicts favorable clinical outcome in invasive ductal carcinoma of breast independent of NT-3 expression. **Am J Cancer Res** 2014; 4:811-23.

Zhao XX, Yuan QZ, Mu DP, et al. MicroRNA-26a inhibits proliferation by targeting high mobility group AT-hook 1 in breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:368-73.

Zheng R, Pan L, Gao J, et al. Prognostic value of miR-106b expression in breast cancer patients. **J Surg Res** 2015; 195:158-65.

Zhou S, Wang GP, Liu C, Zhou M. Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:231.

Zhou X, Marian C, Makambi KH, et al. MicroRNA-9 as potential biomarker for breast cancer local recurrence and tumor estrogen receptor status. **PLoS One** 2012; 7:e39011.

Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of IGF and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene** 2008; 27:7094-105.

Yau C, Wang Y, Zhang Y, Foekens JA, Benz CC. Young age, increased tumor proliferation and FOXM1 expression predict early metastatic relapse only for endocrine-dependent breast cancers. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 126:803-10.

Yin X, Kim RH, Sun G, Miller JK, Li BD. Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E is correlated with increased risk for systemic dissemination in node-positive breast cancer patients. **J Am Coll Surg** 2014; 218:663-71.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

São Paulo, 03 de abril de 2012.

A
Dra. Maria Mitzi Brentani.

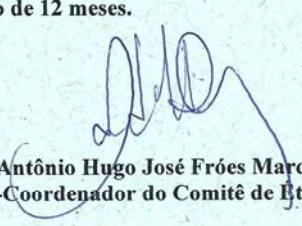
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1656/12
“Análise dos perfis de expressão gênica e de microRNAs para identificar marcadores associados à agressividade do carcinoma mamário em mulheres jovens”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 13/03/2012, aprovaram a realização do protocolo do estudo em referência datado de 2011 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) - Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncogenética do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital A. C. Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - 602 gene-alvos possivelmente regulados por pelo menos 1 dos nossos 8 miRs

GeneSymbol	Afirmação gene	miR	website predicted
AACS	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
AASDHPPT	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
ABCB8	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-18b	4
ABCC5	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-210	3
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	4
ABCC9	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	4
ABCD1	AJ > MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-210	5
ABHD4	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	3
ABHD9	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	5
ABL1	AJ > MI	hsa-miR-210	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	4
ACIN1	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
ACTB	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	4
ACTR2	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
ADIPOR2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
AFF3	AJ < MI	hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	4
AHCY	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
AHCYL1	AJ > MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	3
AIP	AJ > MI	hsa-miR-372	3
AKAP6	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3

		hsa-miR-106b	6
ALDH1A2	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	6
ALPK1	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	4
ANGEL2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	5
ANKFY1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	3
		hsa-miR-18b	6
ANKRD17	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
ANKRD34A	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
ANKRD7	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
ANLN	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	4
ANXA5	AJ > MI	hsa-miR-18b	4
AP3M2	AJ < MI	hsa-miR-372	3
AP3S2	AJ > MI	hsa-miR-18b	5
AP4E1	AJ < MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
APH1B	AJ < MI	hsa-miR-372	4
ARHGAP19	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
ARID1B	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	3
ARL1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
ARMCX5	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
ARSG	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	3
ASCC2	AJ > MI	hsa-miR-18b	5
ASPHD2	AJ > MI	hsa-miR-9	3
ATF3	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-518a-3p	3
ATF7IP2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
ATP6V1G1	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
ATP8B4	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
ATXN2L	AJ > MI	hsa-miR-18b	5
B3GNT7	AJ < MI	hsa-miR-33b	3

BAALC	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
BACE1	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
BAG4	AJ < MI	hsa-miR-9	6
BCAS1	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
BCL2	#N/D	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-518a-3p	4
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-106b*	3
BCL2L1	#N/D	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-106a	4
BCL7A	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	4
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-18b	3
BCOR	AJ > MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
BDNF	AJ < MI	hsa-miR-210	3
BET1L	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
BMP3	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
BPHL	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
BRCA1	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
BTN2A1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-210	3
C10orf118	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3

		hsa-miR-106b	5
C10orf140	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
C10orf76	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
C11orf54	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
C12orf41	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
C14orf145	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
C19orf55	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
C1orf128	AJ > MI	hsa-miR-210	5
C1orf27	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
C1orf43	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	6
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-18b	3
C1orf9	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	7
		hsa-miR-18b*	3
C20orf4	AJ > MI	hsa-miR-9	5
C2orf42	AJ < MI	hsa-miR-372	3
C2orf63	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
C3orf52	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-106b*	3
		hsa-miR-18b	3
C6orf182	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
C6orf201	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
C7orf45	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
C7orf58	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
C8orf4	AJ > MI	hsa-miR-372	3

C9orf114	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-18b	5
C9orf78	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
CA7	AJ < MI	hsa-miR-9	4
CABP5	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
CALN1	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-106b*	3
CAMK2G	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-18b	3
CAPZB	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	3
CASC1	AJ < MI	hsa-miR-372	3
CASP7	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
CCBE1	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
CCDC126	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-18b	3
CCDC47	AJ > MI	hsa-miR-372	5
CCDC80	AJ > MI	hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	4
CCKBR	AJ < MI	hsa-miR-210	4
CCL11	AJ > MI	hsa-miR-33b	5
CCL13	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
CCT6B	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
CD109	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
CD300LG	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-18b	5
CD84	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	3
CD93	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-18b	3
CDC40	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	6

		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
CDCA7	AJ > MI	hsa-miR-372	7
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	6
CDCP1	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-210	6
		hsa-miR-18b	5
CDK2	AJ > MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	5
CDON	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-210	5
CEACAM7	AJ > MI	hsa-miR-33b	4
CENPO	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
CHODL	AJ < MI	hsa-miR-33b	4
CHP	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
CHST3	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5
CIAPIN1	AJ > MI	hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
CNGB3	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
CNNM4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	4
COL4A1	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
COMT	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
CRB1	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
CRB2	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
CREB3L3	AJ > MI	hsa-miR-210	5
CSDA	AJ > MI	hsa-miR-9	8
		hsa-miR-18b	4
CSNK1A1	AJ > MI	hsa-miR-9	6
CTAGE1	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
CTDSPL2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	5

		hsa-miR-106b	7
		hsa-miR-106b*	3
CTNNBL1	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
CUGBP2	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
CXCL17	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
CXorf38	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
CYP19A1	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	3
		hsa-miR-18b*	3
CYP4A11	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	3
DAZAP1	AJ < MI	hsa-miR-210	4
DCC	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
DCTN6	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
DDX24	AJ > MI	hsa-miR-33b	5
DDX59	AJ > MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
DDX6	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	4
DGUOK	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
DHCR24	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-33b*	3
DKK2	AJ > MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
DKK3	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
DLC1	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	7
		hsa-miR-18b	3
DLX1	AJ > MI	hsa-miR-210	5
DNAH5	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
DNAJB12	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	5
DNAJB14	AJ < MI	hsa-miR-9	4
DNM1L	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
DNM3	AJ < MI	hsa-miR-9	3

		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
DNMT3A	AJ < MI	hsa-miR-106b	4
DOLPP1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-518a-3p	4
DPM2	AJ > MI	hsa-miR-9	3
DPP3	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
DRD1	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
DSC2	AJ > MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
DSE	AJ > MI	hsa-miR-9	5
DSEL	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	3
DST	AJ < MI	hsa-miR-372	3
DUSP2	AJ > MI	hsa-miR-372	8
		hsa-miR-106b	8
DUSP3	AJ > MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
DUSP8	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	5
		hsa-miR-18b	4
DZIP3	AJ < MI	hsa-miR-9	3
E2F4	AJ > MI	hsa-miR-210	4
EFHC1	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	5
EHD4	AJ < MI	hsa-miR-9	7
EIF2C4	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
EMD	AJ > MI	hsa-miR-9	5
EPHA3	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
ERBB4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	5

		hsa-miR-18b	3
ERCC6	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
ESD	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
ESPN	AJ < MI	hsa-miR-210	4
ESR1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	4
		hsa-miR-18b	3
		hsa-miR-18b*	3
FAM101B	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
FAM107B	AJ < MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
FAM108C1	AJ < MI	hsa-miR-9	4
FAM120AOS	AJ < MI	hsa-miR-9	5
FAM19A1	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106b	4
FAM38B	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-33b	6
		hsa-miR-33b*	3
FAM44A	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	4
FAM53B	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
FAM76B	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
FBLN1	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
FBXL14	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
FBXO11	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
FBXO21	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5

		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	7
		hsa-miR-18b	4
FBXO3	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	6
FBXO33	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-33b	4
FBXO40	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	3
FBXO46	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
FCAR	AJ < MI	hsa-miR-9	3
FERMT1	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	4
FGF1	AJ > MI	hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-210	3
		hsa-miR-18b	3
FKBP6	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
FLJ22167	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	3
FOXK2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
FOXO3	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	3
FXN	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
GAD2	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
GALNTL5	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
GALR1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106b	3
GAPVD1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	4
GARNL4	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	4
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	3

GFAP	AJ < MI	hsa-miR-372	5
GJA9	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
GLB1L3	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
GLRX5	AJ > MI	hsa-miR-9	5
GLT8D3	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	3
GNA12	AJ > MI	hsa-miR-18b	5
GOLGA8A	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	6
GOSR2	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	4
		hsa-miR-18b*	3
GPC4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	4
GRAP	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
GREB1	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
GSG1L	AJ < MI	hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
GSTM4	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
GTF2E2	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
GTF2H5	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
GTPBP2	AJ > MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-372	3
GTSF1L	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
GUCA1B	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
GUCY1A2	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
GYPA	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
HAPLN4	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	4
HCFC2	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
HDDC2	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
HDGF	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
HDLBP	AJ > MI	hsa-miR-210	3
HEPH	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
HERC3	AJ < MI	hsa-miR-18b	5

HERV-FRD	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
HHLA2	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-18b	4
HIATL1	AJ < MI	hsa-miR-210	5
HIBCH	AJ < MI	hsa-miR-106b	3
HIF1AN	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
HIGD1A	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
HNF4G	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	5
HNRNPA2B1	AJ > MI	hsa-miR-33b	5
HNRNPL	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
HNRPDL	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
HPCAL4	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
HS6ST2	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-18b	5
HSDL2	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
HSP90AA1	AJ > MI	hsa-miR-9	6
HTR2C	AJ < MI	hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	6
HTRA2	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
ICA1L	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
IKZF4	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	7
IL16	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
IL28RA	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	3

		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	4
		hsa-miR-18b*	3
IL29	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
ILK	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
IQCC	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
IQCK	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
IRAK4	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106b	4
ISL2	AJ < MI	hsa-miR-9	3
ITGAD	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	5
ITPR1	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
JMJD2C	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106a*	3
KCND1	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
KCNJ10	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
KCNJ13	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
KCNK5	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-18b	3
KIAA0174	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
KIAA0494	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	5
KIAA1045	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-518a-3p	4
		hsa-miR-18b	6
KIAA1147	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	4
KIAA1199	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	6
		hsa-miR-18b*	3
KIAA1529	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
KIF20A	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
KIF6	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
KLF6	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-18b	5
KLHL21	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	3

		hsa-miR-106b	3
KLHL23	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
KLHL4	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-18b	4
KLHL9	AJ < MI	hsa-miR-9	5
KLK2	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
KRTAP9-9	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
KY	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	4
L1TD1	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
L3MBTL	AJ < MI	hsa-miR-106b	4
LACE1	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	3
LAGE3	AJ > MI	hsa-miR-372	3
LAMC2	AJ > MI	hsa-miR-9	7
LAMC3	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-518a-3p	4
		hsa-miR-33b	3
LBA1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
LDB3	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
LDHAL6B	AJ < MI	hsa-miR-372	5
LHPP	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
LIF	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	6
		hsa-miR-18b*	3
LIPH	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
LONP2	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	7
LRP11	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	3
LRRC45	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
LRRC57	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5

		hsa-miR-106b	5
LTV1	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
MAF1	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
MAGI2	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	3
MANEA	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	6
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
MAP3K7IP2	AJ < MI	hsa-miR-9	3
MAPT	AJ < MI	hsa-miR-372	4
MCAM	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
MDGA1	AJ < MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	6
		hsa-miR-18b	6
		hsa-miR-18b*	4
MECR	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
MED8	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-18b	5
METRNL	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
METTL8	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
MFSD11	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
MGA	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
MGAT1	AJ > MI	hsa-miR-9	4
MICB	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106b	4
MKNK2	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-106b*	3
MLC1	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	4

		hsa-miR-106b	4
MLL5	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b*	4
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-106b*	3
		hsa-miR-18b	3
MOBKL1A	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
MOGAT3	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
MRFAP1	AJ > MI	hsa-miR-9	5
MRPL30	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
MRPS10	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-210	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	3
MTCP1	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-18b	5
MTM1	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	4
MTMR15	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
MUC17	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	3
MUT	AJ < MI	hsa-miR-9	3
MXRA7	AJ > MI	hsa-miR-210	3
MXRA8	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	4
MYCL1	AJ > MI	hsa-miR-106b	4
MYCT1	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
MYF5	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
MYH4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	4
MYL9	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	3
MYO16	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
MYO1B	AJ < MI	hsa-miR-9	4
MYT1L	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
NAPEPLD	AJ < MI	hsa-miR-372	5

		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	4
NCAM1	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-18b	3
NCBP2	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
NCOA5	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
NDUFA10	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
NETO1	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
NFE2L1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	4
NICN1	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
NIP30	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-18b	5
NKTR	AJ < MI	hsa-miR-9	5
NOD2	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
NOS1AP	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	4
NPC1L1	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-18b	5
NRSN2	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
NSFL1C	AJ > MI	hsa-miR-9	3
NSUN7	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
NT5DC2	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
NUFIP1	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
NUP210	AJ > MI	hsa-miR-210	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
NXPH3	AJ > MI	hsa-miR-18b	3
OGFRL1	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
OLAH	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
OPRM1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-18b	5
OR2H1	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
ORC6L	AJ > MI	hsa-miR-372	6

		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
OSBPL10	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
PANX3	AJ < MI	hsa-miR-210	5
PAPOLA	AJ > MI	hsa-miR-372	7
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	3
PAQR3	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
PARP12	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
PBK	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	7
PBLD	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	6
PCM1	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-33b	6
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	4
PCMTD1	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
PCSK6	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
PCYT1B	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
PECR	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
PER2	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	3
PEX19	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
PHB	AJ > MI	hsa-miR-9	5
PHF14	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
PHF15	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
PHF20	AJ > MI	hsa-miR-9	3

		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
PHF20L1	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
PIGG	AJ < MI	hsa-miR-106b	3
PIGK	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
PIGL	AJ < MI	hsa-miR-9	4
PIGS	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
PIP3-E	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	4
PIP5K1C	AJ < MI	hsa-miR-18b	6
PKP1	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	4
PLA2G2D	AJ > MI	hsa-miR-9	5
PLEKHA1	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
PLEKHA3	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
PLEKHA7	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-18b	5
PLLIP	AJ > MI	hsa-miR-33b	4
PODN	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
POF1B	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	4
POLH	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
POLI	AJ < MI	hsa-miR-9	5
POLQ	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	7
PPAP2A	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
PPM1A	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
PPM1L	AJ < MI	hsa-miR-9	3

		hsa-miR-372	5
PPM1M	AJ > MI	hsa-miR-9	4
PPP1R1A	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
PPP1R3A	AJ < MI	hsa-miR-33b	4
PPP2R3A	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
PPP2R5C	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
PRIM2	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
PRIMA1	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-18b	5
PRKACA	AJ > MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-106a	4
PRKAG2	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
PRKAR1B	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	3
PRRC1	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
PRSS23	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	6
PTBP2	AJ < MI	hsa-miR-9	7
PTPDC1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
PTPN2	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
PTPN9	AJ > MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
PTPRF	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
PVRL1	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-18b	5
PWWP2A	AJ < MI	hsa-miR-372	3
PYDC1	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
RABEPK	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
RABGAP1	AJ < MI	hsa-miR-372	7
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	7
RACGAP1	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	4
RALGPS1	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
RANBP9	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	3
RAPGEF6	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106b	3
RBM15B	AJ > MI	hsa-miR-106a	3

		hsa-miR-106b*	4
RBM4	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-106a	4
RBM43	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106b	6
RBM46	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	3
RCE1	AJ > MI	hsa-miR-9	4
RELB	AJ > MI	hsa-miR-18b	5
RERG	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-18b	5
RET	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
RFC2	AJ > MI	hsa-miR-106b	3
RFNG	AJ > MI	hsa-miR-372	5
RFT1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	5
RFWD3	AJ > MI	hsa-miR-9	5
RHBDL2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
RHOC	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
RNF141	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	3
RNF149	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
RNF41	AJ > MI	hsa-miR-18b	4
ROR2	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	3
RPL10	AJ > MI	hsa-miR-9	5
RPRM	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
RPS6KA1	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
RRP1B	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-210	5
RTP4	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
RUFY2	AJ < MI	hsa-miR-372	4

		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
RXRG	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
RYR2	AJ < MI	hsa-miR-372	4
SCRN1	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-18b	4
SCRN3	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	5
SCYL2	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
SDHC	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
SEC61A1	AJ > MI	hsa-miR-18b	6
SERPINA10	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	5
SETD5	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	3
SETD6	AJ > MI	hsa-miR-9	4
SF1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
SF3B1	AJ > MI	hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-18b	5
SFRS2B	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
SGSM1	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-106b*	3
SH3BP5	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
SHC4	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
SIRPB1	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
SLC10A7	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	6
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
SLC25A12	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	4
SLC25A35	AJ < MI	hsa-miR-18b	3
SLC25A39	AJ > MI	hsa-miR-372	3
SLC26A8	AJ < MI	hsa-miR-9	5
SLC27A4	AJ < MI	hsa-miR-9	6

SLC2A5	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
SLC38A1	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
SLC46A2	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
SLC4A1	AJ < MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
SLC6A15	AJ < MI	hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
SLC6A16	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
SLC6A3	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-18b	3
SLC6A8	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
SLC8A3	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-210	5
SMAD3	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	4
SNX13	AJ > MI	hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	4
SNX3	AJ > MI	hsa-miR-9	3
SOAT1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
SORBS1	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
SOX11	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
SOX15	AJ < MI	hsa-miR-210	3
SPAG11B	AJ < MI	hsa-miR-9	3
SPATA12	AJ < MI	hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	3
SPRYD4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
SPTLC2	AJ > MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-106b*	3
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
SSR3	AJ > MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-106a	3

		hsa-miR-106b	6
ST13	AJ > MI	hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	6
ST8SIA4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
STARD13	AJ < MI	hsa-miR-9	5
STX16	AJ < MI	hsa-miR-372	4
STXBP4	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
STYK1	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
SUPT7L	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-210	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	5
SURF4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
SVOP	AJ < MI	hsa-miR-9	3
TARBP1	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
TBC1D24	AJ < MI	hsa-miR-210	3
TEX12	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
TFPI2	AJ > MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	3
TGOLN2	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	3
THAP6	AJ < MI	hsa-miR-9	7
		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	7
TJP2	AJ > MI	hsa-miR-33b	4
TLN1	AJ > MI	hsa-miR-9	4
TMEM104	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	4
TMEM109	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	3
TMEM128	AJ < MI	hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
TMEM129	AJ < MI	hsa-miR-9	4
TMEM132B	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5

		hsa-miR-18b	5
TMEM140	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
TMEM176A	AJ < MI	hsa-miR-372	5
TMEM18	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
TMEM25	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	5
TMEM41B	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
TMEM64	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	3
TMEM9B	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
TNFRSF10A	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
TNFSF11	AJ > MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-106b*	3
TNFSF12	AJ < MI	hsa-miR-9	3
TNS1	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-210	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	3
TOX4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
TP53INP2	AJ > MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	6
		hsa-miR-18b	5
		hsa-miR-18b*	3
TPD52L3	AJ < MI	hsa-miR-372	5
TPM1	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
TPM3	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-33b*	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
TRAF4	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
TRIM22	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
TRIP11	AJ < MI	hsa-miR-372	7

		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	3
TRUB1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
TSG101	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	3
TTC27	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
TTN	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-106b	4
UBOX5	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	5
UBQLN1	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
UGT3A1	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
UPK1B	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	6
USF1	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-210	3
USP10	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
USP33	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
USP45	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	4
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	3
USP49	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
USPL1	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
UTY	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
VAV2	AJ < MI	hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
VENTX	AJ < MI	hsa-miR-372	5
VEZT	AJ < MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-106b*	3

VPS13A	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-18b	6
		hsa-miR-18b*	3
VPS45	AJ > MI	hsa-miR-106a	4
VPS54	AJ < MI	hsa-miR-18b	7
WDR21A	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
WDR33	AJ > MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-372	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	4
		hsa-miR-18b	3
WDR91	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
WHSC1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
		hsa-miR-18b	5
WIF1	AJ > MI	hsa-miR-33b	6
WNK3	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	7
XPC	AJ > MI	hsa-miR-9	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
XRN2	AJ > MI	hsa-miR-9	5
YTHDC1	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106a*	3
		hsa-miR-106b	6
YWHAZ	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4
ZBTB39	AJ < MI	hsa-miR-9	6
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
ZBTB4	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	7
		hsa-miR-106a	7
		hsa-miR-106b	7
		hsa-miR-18b	6
ZC3H11A	AJ < MI	hsa-miR-372	6
		hsa-miR-106b	3
ZC3H14	AJ > MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-372	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
ZC3H6	AJ < MI	hsa-miR-9	3

		hsa-miR-372	6
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	3
		hsa-miR-18b	6
ZC3HAV1	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-18b	4
ZDHHC21	AJ < MI	hsa-miR-106a	4
ZDHHC5	AJ < MI	hsa-miR-9	5
ZFP36L1	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	3
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-18b	4
ZFYVE9	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	8
		hsa-miR-106b*	3
ZMAT5	AJ > MI	hsa-miR-106a	3
ZMPSTE24	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	3
ZNF10	AJ < MI	hsa-miR-9	5
		hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-18b	5
ZNF167	AJ < MI	hsa-miR-106a	3
ZNF248	AJ < MI	hsa-miR-9	5
ZNF25	AJ < MI	hsa-miR-372	7
		hsa-miR-106a	6
		hsa-miR-106b	7
		hsa-miR-18b	5
ZNF282	AJ < MI	hsa-miR-9	3
		hsa-miR-518a-3p	5
ZNF343	AJ < MI	hsa-miR-33b	5
		hsa-miR-18b	5
ZNF468	AJ > MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
ZNF485	AJ < MI	hsa-miR-33b	4
ZNF493	AJ < MI	hsa-miR-18b	5
ZNF544	AJ > MI	hsa-miR-33b	3
ZNF594	AJ < MI	hsa-miR-372	5
		hsa-miR-106a	5
		hsa-miR-106b	5
ZNF670	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p	4
		hsa-miR-106a	3
		hsa-miR-106b	5
ZNF680	AJ < MI	hsa-miR-33b	3
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	6
ZNF721	AJ < MI	hsa-miR-106b	3
ZZEF1	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p	5
		hsa-miR-372	4
		hsa-miR-106a	4
		hsa-miR-106b	4

Anexo 3 - Associação entre dados clinicopatológicos e a marcação de RSK1 no TMA

Grau nuclear			Grau histológico			Tamanho do tumor			TNM			Linfonodo			KI67			
1 e 2	3	P	1 e 2	3	P	< 2 cm	≥ 2 cm	P	I e II	III e IV	P	negativo	positivo	P	negativo	positivo	P	
Marcação de RSK1																		
Fraca	6(40%)	9 (60%)	0,22	8 (53%)	7 (47%)	0,29	1 (12%)	7 (88%)	0,15	12 (80%)	3 (20%)	0,78	4 (57%)	3 (43%)	0,3	2 (20%)	8 (80%)	0,24
Forte	1 (14%)	6 (85%)		6 (75%)	2 (25%)		2 (50%)	2 (50%)		6 (75%)	2 (25%)		1 (25%)	3 (75%)		0 (0%)	6 (100%)	

Anexo 4 - 129 gene-alvos exclusivos do estroma, possivelmente regulados por pelo menos 1 dos nossos 8 miRs

<i>GeneSymbol</i>	Afirmação gene	miR
ABCB9	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
ACTR1A	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-210
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-106b*
ALDH1A3	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
ALDH8A1	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
ANUBL1	AJ < MI	hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
AOF1	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
AP1B1	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-106a
ARID2	AJ < MI	hsa-miR-18b
BICC1	AJ < MI	hsa-miR-9
BRWD2	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-106b
C1QTNF7	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
C22orf39	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-33b
C4orf19	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
CAPNS1	AJ > MI	hsa-miR-372
CASD1	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
CCL18	AJ < MI	hsa-miR-33b
CCNK	AJ > MI	hsa-miR-33b
CHCHD7	AJ > MI	hsa-miR-106b

CHD4	AJ < MI	hsa-miR-18b
CHTF18	AJ > MI	hsa-miR-18b
CLCA2	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
CLDN1	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-210
COL9A1	AJ < MI	hsa-miR-9
CR1	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-210
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
DEK	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
DNAJC8	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-18b
		hsa-miR-18b*
DOCK9	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-106b
DOPEY2	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
DUSP9	AJ < MI	hsa-miR-106a
DYRK3	AJ > MI	hsa-miR-33b
EFNB2	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
EGLN1	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-106b*
EIF2B2	AJ > MI	hsa-miR-106a
EPHA10	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-18b
ESRRG	AJ < MI	hsa-miR-106a
FA2H	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
FAM46B	AJ > MI	hsa-miR-106a
FAM84A	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
FMR1NB	AJ < MI	hsa-miR-9
FOXD2	AJ > MI	hsa-miR-210
FUT9	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
G6PC3	AJ > MI	hsa-miR-9
GPBP1L1	AJ < MI	hsa-miR-9
GPR155	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a

		hsa-miR-106b
GPR45	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
GRAMD2	AJ < MI	hsa-miR-372
GULP1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
HOXA9	AJ > MI	hsa-miR-33b
		hsa-miR-210
		hsa-miR-18b
HOXC5	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p
IDI2	AJ < MI	hsa-miR-372
IGF1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-18b
INADL	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
IRF2BP2	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
KCNE1L	AJ > MI	hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-18b
KL	AJ < MI	hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
KRT10	AJ > MI	hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
KRT23	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
LPA	AJ > MI	hsa-miR-372
MAGEB18	AJ < MI	hsa-miR-106a
MASP1	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-18b
MDM4	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
MOXD1	AJ > MI	hsa-miR-106a
MPP2	AJ < MI	hsa-miR-18b
MRE11A	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b

MTHFSD	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
MYO3A	AJ < MI	hsa-miR-106a
NBPF3	AJ > MI	hsa-miR-18b
NID2	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
NRGN	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
OPRL1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-18b
		hsa-miR-18b*
PABPC5	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
PARK2	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-210
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
PCDHAC1	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
PDHX	AJ < MI	hsa-miR-106a
PHF8	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-106a
PKN2	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
PLAG1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-106b*
		hsa-miR-18b
		hsa-miR-18b*
PNPT1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
POU6F1	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
PPIB	AJ < MI	hsa-miR-106a
PRDM10	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*

		hsa-miR-106b
ProSAPiP1	AJ < MI	hsa-miR-9
QRSL1	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
RBM47	AJ < MI	hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
RETSAT	AJ > MI	hsa-miR-33b
RGS6	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-18b
RHO	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
RNF216	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
RSL1D1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
RTN4RL1	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
SH2D5	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
SIRPG	AJ > MI	hsa-miR-33b
SIX4	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
SLC1A2	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-210
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
SLC25A42	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
SLC30A7	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
SLC5A12	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b

		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
SLC7A13	AJ < MI	hsa-miR-106a
SLMO1	AJ > MI	hsa-miR-9
SMCHD1	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
SNX26	AJ > MI	hsa-miR-210
SPATA2	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
SRPX	AJ > MI	hsa-miR-372
SRrp35	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
SSBP3	AJ > MI	hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
SYT13	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
TBC1D20	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
TCTA	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
TDRKH	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
TFE3	AJ < MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-18b*
TMC1	AJ < MI	hsa-miR-33b
TMEM133	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-18b
TMEM196	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-372
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
TMEM87A	AJ > MI	hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
TRMT6	AJ > MI	hsa-miR-18b
TSPAN12	AJ > MI	hsa-miR-106a
TUBB4	AJ > MI	hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-18b

TUBGCP4	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106a*
		hsa-miR-106b
UQCRQ	AJ > MI	hsa-miR-18b
URG4	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
VGLL4	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-518a-3p
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
		hsa-miR-106b*
XIRP1	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
XPNPEP1	AJ < MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-18b
XPO1	AJ > MI	hsa-miR-33b
ZCCHC3	AJ > MI	hsa-miR-9
ZNF100	AJ > MI	hsa-miR-9
		hsa-miR-33b
		hsa-miR-33b*
		hsa-miR-18b
ZNF70	AJ > MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-106a
		hsa-miR-106b
ZNF767	AJ < MI	hsa-miR-372
		hsa-miR-210
ZRANB2	AJ < MI	hsa-miR-33b

Anexo 5 - Resumo do trabalho apresentado no congresso Keystone Symposia

MicroRNAs involved with aggressiveness of young breast cancer patients as compared to post-menopausal patients.

Elen P. Bastos¹, Rosimeire Roela², Fatima S. Pasini², Adriano Polpo², Adriana Trape³, Lucimeire Santana¹, Carlos A. B. Pereira², Helena Brentani², M. Mitzi. Brentani².

¹Ac.Camargo Cancer Center, São Paulo,BR; ²University of São Paulo,BR;³ MD Anderson Hospital,TX, USA

Breast cancer (BC) in young patients has a more aggressive biological behavior and is associated with a worse prognosis than tumor arising in older patients. Previous reports suggested that BC in very young women appears to present distinct biological features as compared to post-menopausal patients leading to different treatment strategy. Mutation in *BRCA1/2* genes may contribute to the poor prognosis of BC at a very young age. However it could not explain the majority of cases. MicroRNAs (miRs) have been implicated in regulating pathways involved with BC malignancy. The aim of our study was to identify differences in miRs expression profile and miR/mRNA/protein network between sporadic tumors (non-carriers of *BRCA1/2* mutations) from young patients (under 35 years) and post-menopausal patients (50 to 65 years). Fifty Brazilian patients were divided into pre-menopausal (PRE-BC) or post-menopausal breast cancer (POST-BC) groups. All tumors were classified as presenting a luminal phenotype. High grade tumors were significantly detected in young patients ($P<0.05$) as compared to the other group. Using qPCR we identified 8 miRs differently expressed (up regulated: miR-9 18b, 33b 106a 106b 210 and 518a-3p; down regulated: miR-372) in PRE-BC than in POST-BC group with high accuracy. Some of these miRs were involved with the PI3-Kinase signaling pathway. Transcriptome and proteomic were explored using microarray and reverse phase protein array, respectively. Combined results from miRs/mRNA/effectors network identified positive or negative correlation. Co-expression analyses of these miRs/mRNA/effectors network distinguished early onset cancer from their older counterparts suggesting that the former presented biological characteristics that may be involved with tumor aggressiveness. Financial support: FAPESP.

Anexo 6 - Resumo do trabalho apresentado no congresso *Gordon Research*

MicroRNA and their gene targets expression patterns associated with aggressiveness of sporadic breast cancer in young (≤ 35 years) and post-menopausal patients.

Elen P. Bastos¹, Fatima S. Pasini², Rosimeire A. Roela², Adriano Polpo³, Carlos A. B. Pereira⁴, Helena Brentani⁵, M. Mitzi Brentani².

¹Ac.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil; ²Oncology and Radiology Department, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Departamento of Statistics, Federal University of Sao Carlos, Brazil; ⁴Mathematics and Statistics Institute, University of São Paulo, Brazil; ⁵Institute and Department of Psychiatric, LIM23, University of São Paulo, Brazil

Abstract: Breast cancer (BC) in young patients has a more aggressive biological behavior and is associated with a worse prognosis than BC arising in older patients. Previously published studies suggested that BC in young adult patients appears to present distinct biological features, others considered over representation of aggressive subtypes underlined these tumor characteristics. The influence of genetic and epigenetic factors may contribute to the poor prognosis of BC at young adult aged ≤ 35 years. However, *BRCA1/2* mutations could not explain the majority of cases arising in these patients. MicroRNAs (miRs) have been implicated in genetic and epigenetic aspects of BC. The aim of our study was to evaluate differences in miRs expression and miR:mRNA interactions between sporadic tumors from pre-menopausal (≤ 35 years) and post-menopausal patients (50-65 years) non-carriers of *BRCA1/2* mutations. Fifty Brazilian patients were divided into 2 groups: pre-menopausal (PRE) or post-menopausal (POST) breast cancer. All tumors were classified as presenting a luminal phenotype but aggressive characteristics were more evident in PRE tumors such as larger tumor size and advanced histological grade which were statistically significant different ($P < 0.05$) than in POST tumors. Using real time qPCR we identified 8 miRs differently expressed (over expression: miR-9 18b, 33b 106a 106b 210 and miR-518a-3p; under expression: miR-372) in PRE than in POST tumors with more than 90% of confidence. The over expression of miR-9, 33b 210, and low expression of miR-372 were correlated with tumors pathologic aggressive features and low expression of miR-210 106b, 518a-3p were associated with smaller tumor size and less advanced TNM. All these miRs were previously described as being associated to different types of cancer. Some of these miRs were reported as oncomiRs. Candidate predicted targets were determined by miRWalk algorithms. Combined results from miRWalk with mRNA expression profiles

by microarray, identified potential candidate genes showing direct regulation or indirect regulation by these miRs. These 602 miR:mRNA direct/indirect interactions showed enriched biological functions related to proliferation, cell cycle and development. In addition, the combination of eight mRNAs directly regulated by miRs were considered potential classifiers since samples were correctly distributed with 88% of confidence to PRE and 85% to POST groups. In conclusion, differential expression analyses of these miRNA:mRNA interactions distinguished early onset from late onset breast cancer suggesting that the former presented biological characteristics that may be involved with tumor aggressiveness. FAPESP



MicroRNAs Discriminate Familial from Sporadic Non-BRCA1/2 Breast Carcinoma Arising in Patients ≤ 35 Years

Elen Pereira Bastos^{1*}, Helena Brentani², Fatima Solange Pasini¹, Aderbal Ruy T. Silva², Cesar Henrique Torres², Renato David Puga³, Eloisa Helena Ribeiro Olivieri⁴, Amanda Rusiska Piovezani⁵, Carlos Alberto de Bragança Pereira⁵, Ariane Machado-Lima⁶, Dirce Maria Carraro⁴, Maria Mitzi Brentani¹

1 Oncology and Radiology Department, Laboratory of Medical Investigation 24 (LIM 24), University of São Paulo, Medical School, São Paulo, Brazil, **2** Laboratory of Clinical Pathology – Laboratory of Medical Investigation 23 (LIM 23), Institute and Department of Psychiatry, University of São Paulo, Medical School, São Paulo, Brazil, **3** Clinical Research Center - Hospital Israelita Albert Einstein- HIAE, São Paulo, Brazil, **4** Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Research Center (CIPE), A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, **5** Mathematics and Statistics Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **6** School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

The influence of genetic factors may contribute to the poor prognosis of breast cancer (BC) at a very young age. However *BRCA1/2* mutations could not explain the majority of cases arising in these patients. MicroRNAs (miRs) have been implicated in biological processes associated with BC. Therefore, we investigated differences in miRs expression between tumors from young patients (≤ 35 years) with sporadic or familial history and non-carriers of *BRCA1/2* mutations. Thirty-six young Brazilian patients were divided into 2 groups: sporadic (NF-BC) or familial breast cancer (F-BC). Most of the samples were classified as luminal A and B and the frequency of subtypes did not differ between familial or sporadic cases. Using real time qPCR and discriminant function analysis, we identified 9 miRs whose expression levels rather than miR identity can discriminate between both patient groups. Candidate predicted targets were determined by combining results from miRWalk algorithms with mRNA expression profiles ($n=91$ differently expressed genes). MiR/mRNA integrated analysis identified 91 candidate genes showing positive or negative correlation to at least 1 of the 9 miRs. Co-expression analysis of these genes with 9 miRs indicated that 49 differentially co-expressed miR-gene interactions changes in F-BC tumors as compared to those of NF-BC tumors. Out of 49, 17 (34.6%) of predicted miR-gene interactions showed an inverse correlation suggesting that miRs act as post-transcriptional regulators, whereas 14 (28.6%) miR-gene pairs tended to be co-expressed in the same direction indicating that the effects exerted by these miRs pointed to a complex level of target regulation. The remaining 18 pairs were not predicted by our criteria suggesting involvement of other regulators. MiR-mRNA co-expression analysis allowed us to identify changes in the miR-mRNA regulation that were able to distinguish tumors from familial and sporadic young BC patients non-carriers of *BRCA* mutations.

Citation: Bastos EP, Brentani H, Pasini FS, Silva ART, Torres CH, et al. (2014) MicroRNAs Discriminate Familial from Sporadic Non-BRCA1/2 Breast Carcinoma Arising in Patients ≤ 35 Years. PLoS ONE 9(7): e101656. doi:10.1371/journal.pone.0101656

Editor: Sonia Rocha, University of Dundee, United Kingdom

Received: February 4, 2014; **Accepted:** June 10, 2014; **Published:** July 9, 2014

Copyright: © 2014 Bastos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by FAPESP (2009/10088-7) and CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: elenbastos@hotmail.com

Introduction

Breast Cancer (BC) in patients below the age of 35 years is uncommon, occurring in only 2%–10% of the cases. However, this frequency may differ among different ethnic groups [1–6].

Despite intense treatment, the prognosis in young BC patients, particularly in black women, is worse than that in their older counterparts [2,5,7,8]. This fact has been partially attributed to the high frequency of unfavorable tumor characteristics [9–12].

The influence of genetic factors may contribute to the poor prognosis, but familial history of cancer explains only 10%–37% of the cases, of which 10%–25% were attributable to *BRCA1/2* mutations, which are currently known as the 2 major BC predisposing genes [13,14]. In sporadic cases, this frequency is still smaller, ranging from 3%–10% [15].

Anders and coworkers [9] have suggested that BC in young woman is a unique biological entity. Other studies have shown that its aggressive nature may be explained by the high frequency

of aggressive intrinsic BC subtypes and grades, both of which were correlated with age [16,17]. However, a recent gene expression profiling meta-analysis proposed that BC at young age appears to be biologically distinct beyond subtype distribution [18].

We recently reported a study of 54 young Brazilian patients (≤ 35 years). Of these, 29% presented a familial cancer history and specifically, 37.5% were carriers of germ line mutation in the *BRCA1/2* genes, which was displayed by only 8.6% of the tumors from non-familial BC cases. In addition, gene expression profiling appropriately discriminated tumors according to the presence/absence of *BRCA1/2* germ line mutations [19]. However, gene expression profile differences between familial and sporadic early onset BC patients who were not carriers of *BRCA1/2* mutations were not found.

An additional improvement of gene signatures could be found from the examination of microRNAs (miRs), which have recently emerged as important players in BC development, progression, and metastasis [20,21]. MiRs are a class of small non-coding

RNAs that post transcriptionally regulate the expression of protein-coding genes opening a new area of marker research complementary to the transcriptional gene signature. Differentially expressed miRs were identified according to different BC molecular subtypes [22], metastasis, and overall survival [23,24]. However, little is still known about the involvement of miRs in the molecular mechanisms underlying the aggressiveness of BC in young women. An association between miR-146a phenotype and tumor age-of-onset in *BRCA1/2*-negative familial BC cases has been reported [25,26]. In addition, a recent study highlighted that non-*BRCA1/2* hereditary BC may be sub-classified using specific miR signatures [27]. Recently, Estal and coworkers suggested that the miR expression profile may facilitate the identification of sporadic BC carrying genetic/epigenetic changes in *BRCA* genes [28]. Our specific aims in the current study were (A) to identify a miR expression signature that could discriminate between familial and sporadic BC in young patients (≤ 35 years) who are non-carriers of *BRCA1/2* mutations; and (B) to identify candidate target-genes related with the differentially expressed miRs.

Materials and Methods

Patients

Tumor samples were collected, processed and provided by A. C. Camargo Biobank (São Paulo, SP, Brazil) from breast cancer patients aged thirty five years or less, undergoing surgery, after genetic counseling and signature of an informed consent form. This study was approved by the Ethical Board for Research Project Analysis (CEP) of the A. C. Camargo Cancer Center (research protocol 1656/12) and was conducted in accordance to the Helsinki Declaration.

The *BRCA1/2* status was determined in DNA extracted from peripheral blood samples, and patients with relevant mutations were excluded from subsequent analyses. Thirty-six patients who were not carriers of *BRCA1/2*, *TP53*, or *CHEK2* mutations were considered for analysis in the present study and segregated into 2 groups: familial breast cancer (F-BC) ($n = 10$) and sporadic breast cancer [non-familial (NF-BC)] ($n = 26$), according to *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* guidelines updated in 2011. The thirty-six patients included in the present study were also present in a previous report of our group [19]. In **Table 1**, we have reported the clinical descriptors of all these patients, including pathological features of the tumor specimens obtained from them, e.g., histological type, disease staging (TNM) at diagnosis, and histological grade. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Her-2 status were determined by immunohistochemistry. Only tumor samples with distinct nuclear immunostaining in $\geq 10\%$ of the cells were recorded as ER or PR-positive. Her-2 status was considered positive if the membrane staining reaction was defined as 3+. In unsure cases (2+), fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was additionally performed. Tumors were further classified as luminal A or B, Her-2-rich, and triple negative. The classification of BC subtypes was determined by proxies of the molecular subtypes following the model proposed by Carey and coworkers [29] in which luminal A indicated ER⁺, and/or PR⁺ and HER-2⁻; subtype luminal B exhibited ER⁺, and/or PR⁺ and HER-2⁺; Her-2-rich presented Her-2 over expressed or amplified and absent ER/PR and subtype triple negative indicated ER⁻, PR⁻, HER-2⁻.

Total RNA and DNA isolation

Frozen tumor tissue (approximately 30 mg) was homogenized with Precellys 24 equipment (Carlsbad, California, USA). The supernatant was used to purify total RNA with the RNeasy Mini

kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands) according to the manufacturer's protocol. RNA quality and concentration were assessed using a ND-1000 NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) and the integrity was determined using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). The DNA extractions from peripheral blood methodology as well as the sequencing reaction and mutation analyses were described in a recent publication of our group [19].

MicroRNA expression profiling

A global profiling of miR expression in these 36 tumor samples was performed using the TaqMan Low Density Array Human microRNA assay panel A (TLDA, Life Technologies). The array panel A contains 377 *homo sapiens* miRs and 7 endogenous controls (ribosomal RNAs) for a total of 384 probes. Reverse transcription was performed with the RT-miRs kit and the pre-amplification with the pre-amplification kit (Life Technologies) from 350 ng of total RNA using the manufacturer's protocols. Real time PCR (RT-PCR) was performed according to the 7900 HT Real Time PCR Systems protocol using 2× Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Life Technologies).

The expression value, measured as cycle threshold (CT), of each miRs was obtained using SDS 1.2 software (Life Technologies: TaqMan OpenArray Real-Time PCR Plates). MiRs presenting expression levels below the detection limit (>38) in more than 60% of the samples were excluded from analyses. To calculate the expression of miRs for each tumor sample, the delta CT method was used and normalization was performed with the RNU48 endogenous control assay (CT of miR - CT of RNU48). The differences in miRs expression levels (fold change) were calculated from the ratio of mean $2^{-\Delta CT}$ of a tumor sample from F-BC group relative to the mean $2^{-\Delta CT}$ of NF-BC tumors samples [30]. The normalization between samples was performed by *limma library R version 2.13* [31].

Statistical comparisons of miRs expression between F-BC and NF-BC were performed using *Significance Analysis of Microarrays (SAM)* test with adjusted FDR (0%) by *MeV* program (*Multi Experiment Viewer v.4.5*).

Messenger-RNA expression profiling

All 36 tumors from F-BC and NF-BC patients were included in the messenger RNA (mRNA) expression analyses. The mRNA expression profiling was performed with one-color labeled cDNAs from 500 ng of total RNA and was reverse-transcribed into double-stranded cDNA with the MMLV reverse transcriptase enzyme and primed with the oligo-dT-T7 polymerase promoter sequence. The Cy3-labeled cDNA was then transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase. The quantity and efficiency of the labeled amplified Cy3-cDNA were determined with a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Labeled cDNAs were hybridized to the Agilent B4X44K G4112F whole human genome oligoarray (Agilent, Santa Clara, USA). All microarray raw data have been deposited in the GEO public database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), a MIAME compliant database, under accession number GSE37126. **Table S1** shows corresponding array slide numbers to the sample ID used in the present study. Gene expression profiling was performed with a permuted student's T-test (MEV, TM4 software) using the *MeV* program (*Multi Experiment Viewer v.4.5*) [32,33].

Discriminant analyses

Linear discriminant analysis was performed to assess the ability of miRs to correctly classify patients into groups (F-BC and NF-BC). A second discriminant analysis called cross-validation [34]

Table 1. Patient and sample characteristics.

ID	Age	Grade	TNM	Subtype	Familial (NCCN criteria)	ER	PR	Her-2
NF-BC 1	33	GN3/GH3	IIA	Luminal B	(-)	POS	POS	POS
NF-BC 2	35	GN3/GH2	IIA	Luminal B	(-)	POS	POS	POS **
NF-BC 3	33	GN3/GH3	IIIB	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 4	25	GN2/GH2	IV	Trip. NEG	(-)	NEG	NEG	NEG
NF-BC 5	33	GH2/GN3	IIIB	Luminal A	(-)	POS	NEG	NEG
NF-BC 6	30	GN2/GH2	IIIB	Luminal B	(-)	POS	POS	POS
NF-BC 7	26	GN3/GH3	IIIB	Trip. NEG	(-)	NEG	NEG	NEG
NF-BC 8	29	GN3/GH3	IIA	Luminal A	(-)	POS	NEG	NEG
NF-BC 9	33	GN2/GH2	IIIA	Luminal A	(-)	POS	NEG	NEG
NF-BC 10	35	GN3/GH3	IIA	Trip. NEG	(-)	NEG	NEG	NEG
NF-BC 11	34	GN2/GH1	IIA	Luminal B	(-)	POS	NEG	POS
NF-BC 12	36	GN3/GH3	IIA	Luminal B	(-)	POS	POS	POS
NF-BC 13	35	GN3/GH2	IIIB	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 14	32	GH2	IIA	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 15	34	GN3/GH2	IIIB	Trip. NEG	(-)	NEG	NEG	NEG
NF-BC 16	30	GH2	IIIB	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 17	29	GH2	IIA	Luminal B	(-)	POS	POS	POS
NF-BC 18	31	GH2	IIIA	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 19	33	GN2/GH1	IIA	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 20	35	GH2	IIIB	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 21	28	GN2/GH2	IIA	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
NF-BC 22	33	GH2/GN2	IIIB	Luminal A	(-)	POS	NEG	NEG
NF-BC 23	33	NA	IIA	Luminal A	(-)	POS	NEG	NEG
NF-BC 24	26	GN3/GH2	IIIA	Luminal B	(-)	POS	POS	POS
NF-BC 25	22	GN3 GH2	IIA	Her-2	(-)	NEG	NEG	POS
NF-BC 26	34	GH2	IIIA	Luminal A	(-)	POS	POS	NEG
F-BC 1	28	GN3/GH2	IIIB	Luminal B	(+)	POS	POS	POS
F-BC 2	34	GN3/GH2	IIIB	Luminal A	(+)	POS	POS	NEG
F-BC 3	35	GN3/GH2	IIA	Luminal A	(+)	POS	POS	NEG
F-BC 4	29	GN3/GH3	IIIA	Luminal A	(+)	POS	POS	NEG
F-BC 5	29	GN3/GH3	IIA	Trip. NEG	(+)	NEG	NEG	NEG
F-BC 6	29	GN3/GH3	IIIB	Luminal A	(+)	POS	POS	NEG

Table 1. Cont.

ID	Age	Grade	TNM	Subtype	Familial (NCCN criteria)	ER	PR	Her-2
F-BC 7	34	GN3/GH2	IIB	Luminal A	(+)	POS	POS	NEG
F-BC 8	33	NA	I	Luminal A	(+)	POS	NEG	NEG
F-BC 9	29	NA	I	Luminal A	(+)	POS	POS	NEG
F-BC 10	28	GN3/GH3	IIIB	TriplNeg	(+)	NEG	NEG	NEG

POS = positive; NEG: negative; Trip: triple negative; GN: nuclear grade; GH: histological grade; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER-2: growth factor receptor type 2; NCCN: National Comprehensive Cancer Network; ER, PR, and Her-2 receptor status was defined according to IHC.TNM = tumor classification based on stage according to TNM criteria suggested by WHO (World Health Organization): I (T1N0M0); IIA (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0); IIB (T2N1M0, T3N0M0); IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0); IIIB (T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0); IV (every T, N, and M1).
doi:10.1371/journal.pone.0101656.t001

was performed and the proportion of samples classified on each group was recalculated.

Targets prediction and selection of candidates

Putative targets were inferred for each miR using the miRWalk prediction program database algorithms which extract predictions from TargetScan, Diana microT 4.0, Miranda, RN22 and Pictar (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>). The final miR-target prediction results were a combination of the queries. Targeting criteria were as follows (a) near-perfect complementarity in the 7–8 nt region close to 5'-end of the miR (seed sequence) with the 3'-UTR region of target sequence; (b) conserved target sequence sites between species; (c) strong thermodynamic stability of miR-mRNA duplex; (d) complementarity between multiple sites; (e) existence of a central non-matched region (loop).

The final selection of target candidates was established by combining genes predicted by the miRWalk data base and also exhibiting differential expression from the microarray experiment profile.

Co-expression analyses

We performed a co-expression analysis based on a method analogous to that previously described [35]. First, differentially expressed miRs and mRNAs between F-BC and NF-BC BC groups were selected and then, the co-expression correlation between each miR-mRNA interaction was calculated separately for each group using the Pearson correlation coefficient (PCC). Then, co-expression matrixes between differentially expressed genes and miRs were constructed for the F-BC and NF-BC groups. Second, to determine alterations in the co-expression pattern between the 2 groups, the absolute value of the difference of correlations in these PCCs was calculated. To determine whether the deviation in correlation between the 2 groups was significant, we randomly reassigned the patients to one of the groups and repeated the analysis. This was performed 100,000 times to calculate the random distribution. Real PCC differences for miR-RNA pairs between patient groups were compared to the random distribution to generate p values.

Validation of miRs and targets

MiRs validation was performed by reverse transcription (RT) and quantitative PCR (qPCR) with individual TaqMan Assays from Life Technologies. From 10 ng of total RNA we synthesized cDNA using TaqMan RT reaction components following manufacture's protocol (Life Technologies), and qPCR was performed in duplicates and accordantly to the 7900 HT Real Time PCR Systems protocol using 2× Universal PCR Master Mix, no Amp Erase UNG (Life Technology).

For mRNA-target validation the RT was performed with Super Script III – First Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Life Technologies) using random hexamer primers (0.05 µg/µL) and total RNA (1 µg). The cDNA samples (2 ng) were subjected to qPCR assays in triplicate using SYBR Green methodology with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), followed by 7900 Real Time (Life Technologies). Gene-specific primers were designed using the Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) to generate a PCR product in the 3' portion, spanning the translated region of the target mRNA. Sequences present in different exons, preferentially separated by long introns, were selected, according with sequences deposited at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. To avoid non-specific product formation, BLAST analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) was carried out. The reaction conditions used to all primers were:

Table 2. Frequency of clinical and histopathological characteristics according to the groups—familial breast cancer (F-BC) and sporadic breast cancer (NF-BC).

Clinic status	Category	F-BC n (%)	NF-BC n (%)	TOTAL n (%)	P
Stage	I-II	8 (80)	19 (73)	27 (75)	1.0
	III-IV	2 (20)	7 (27)	9 (25)	
Histological grade	I-II	4 (50)	18 (75)	22 (68.8)	0.38
	III	4 (50)	6 (25)	10 (31.2)	
Nuclear grade	II	0 (0)	6 (33.3)	6 (16.6)	0.13
	III	8 (100)	12 (66.7)	20 (55.5)	
ER	Positive	7 (70)	21 (81)	28 (78)	0.64
	Negative	2 (20)	6 (23)	8 (22)	
PR	Positive	7 (70)	15 (58)	22 (61)	0.70
	Negative	3 (30)	11 (42)	14 (39)	
Her-2	Positive	1 (10)	8 (31)	9 (25)	0.39
	Negative	9 (90)	18 (69)	27 (75)	

doi:10.1371/journal.pone.0101656.t002

95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and annealing temperature of 59°C, 60°C or 62°C for 60 seconds (**Table S2**).

To calculate the expression of miRs for each tumor sample, the delta delta CT method was used and normalization was performed with the RNU48 endogenous. The F-BC 11 sample was considered as reference.

To calculate the expression of target-mRNAs, NF-BC 33 sample was considered as reference sample based on Pfaffl method: ratio = $(E_{\text{target}})^{\Delta \text{CP}} / (E_{\text{NF-BC 33}})^{\Delta \text{CP}}$. The differences in miRs and target expression levels (fold change) were calculated from the ratio of $2^{-\Delta \Delta \text{CT}}$ or Pfaffl ratio, respectively, of F-BC group relative to NF-BC tumor samples.

Results

All 36 tumors were classified as infiltrative ductal carcinomas and displayed grade 2 or 3. The clinical stage at diagnosis as well as the histological grade and tumor markers were similarly

distributed in sporadic or familial cases. Most of them were classified as luminal A and B and the frequency of the subtypes did not differ between familial or sporadic cases (**Table 2**).

Differentially expressed miRs

In an attempt to identify a miR signature that separates familial and sporadic breast carcinoma, we profiled miR expression on 36 tumor samples derived from 26 sporadic (NF-BC) and 10 familial patients (F-BC), using a miR platform containing 377 miRs. As 1 sample (F-BC 3 in **Table 1**) was excluded from the analyses due to a weak normalization result, only 35 tumor samples were further analyzed.

Among the 377 miRs contained in the array panel, 121 showed an expression level below the detection limit (CT > 38) in more than 60% of the samples in both groups and were excluded for downstream analyses. While comparing F-BC and NF-BC using a Significance Analysis of Microarrays (SAM) statistical test (FDR = 0 and a delta value of 0.77), 9 miRs out of 256 showed significantly differentiated expression. Among them, 3 miRs (miR-486-3p, miR-874, and miR-98) were downregulated, whereas 6 miRs (miR-124, miR-210, miR-381, miR-455-3p, miR-501-5p, and miR-660) were upregulated in F-BC tumors as compared with tumors of NF-BC patients (**Table 3**).

Discriminant analyses

A discriminant analyses indicated that the 9 miRs differentially expressed could discriminate tumors between F-BC and NF-BC. The graphic (**Figure 1**) indicated 82% of accuracy in the distribution of the 35 patients between both groups. Out of 35 patients, 3 (NF-BC 7, NF-BC 9, and F-BC 8) were not correctly classified.

On cross-validation analysis, 1 patient was removed from the analysis, a new discriminant function was estimated and the removed patient was reclassified. Performing this procedure with all the patients, we had a classification accuracy of 88% and 92% for F-BC and NF-BC patients, respectively.

Differentially expressed mRNA

Differences in gene expression profiling of F-BC compared to NF-BC were assessed with a permuted student's T-test and genes were considered differentially expressed when $P \leq 0.01$. The gene

Table 3. MiRs differentially expressed between F-BC and NF-BC.

miRs	Fold-change (F-BC/NF-BC)
hsa-miR-124	10.08
hsa-miR-210	7.32
hsa-miR-455-3p	4.28
hsa-miR-660	2.65
hsa-miR-381	2.47
hsa-miR-501-5p	2.15
hsa-miR-98	-2.29
hsa-miR-486-3p	-4.53
hsa-miR-874	-4.70

Fold change expression between comparison of F-BC and NF-BC was considered significant with an FDR (false discovery rate) = 0 and a delta value of 0.77.

doi:10.1371/journal.pone.0101656.t003

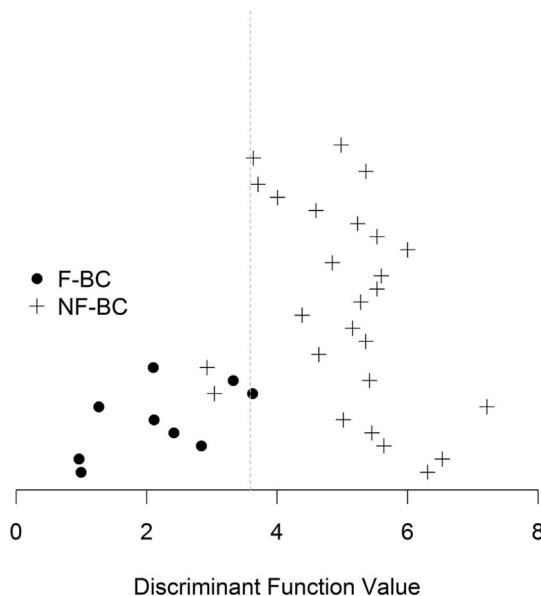


Figure 1. Cross-validation analysis graphic. Representative cross-validation analysis graphic of 35 patients from the F-BC and NF-BC groups. Black spots indicate F-BC samples while plus signs indicate NF-BC samples. The line represents the limit discriminant function between groups. F-BC, familial breast cancer; NF-BC, non-familial breast cancer. doi:10.1371/journal.pone.0101656.g001

expression profile led to 1599 probes representing 1415 unique differentially expressed genes. Among 1415, 742 probes were downregulated and 857 probes were upregulated.

Targeting prediction and selection of candidate genes

The number of predicted targets for each of the 9 differentially expressed miRs among F-BC and NF-BC patients, ranged from 2594 unique targets for miR-381 to 342 targets for miR-210, for a total of 14294 targets (**Figure 2**). To select candidate genes, we combined the list of 1415 differentially expressed genes from our microarray experiment with the 14294 predicted targets from the miRWalk data base and examined only the intersection. This analysis yielded 91 unique differentially expressed predicted target-genes correlated with at least 1 out of 9 miR regulators. Out of 91, 34 showed down expression and 57 showed over expression. Supposedly candidate target-gene should exhibit an inverse expression level compared to the correspondent miR, however we also found miRs that were coordinately correlated with their targets. (**Table S3**).

Co-expression analyses

To assess the differences of miRs and gene interaction patterns between F-BC and NF-BC, we performed co-expression analysis. Co-expression matrixes with 91 candidate genes against 9 miRs were performed separately for the F-BC and NF-BC groups (**Figures 3A and 3B**). We found 49 miR-mRNA interactions, including those with predicted or not predicted genes for correspondent miR, which presented statistically significant differences in co-expression between F-BC and NF-BC ($P < 0.05$) (**Table S4**). Not predicted interactions were defined as those showing differences in co-expression between the groups but in which miR-mRNA interactions not fulfilled our target prediction criteria. Once miRs have a negative regulatory role on their mRNA targets, we selected miRs-mRNA interaction fulfilling the condition that the expression levels of the genes should be inversely

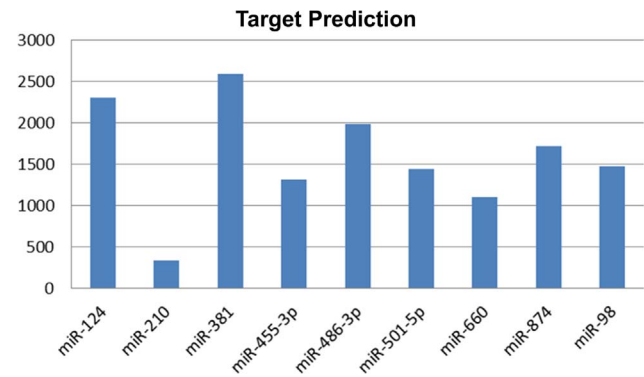


Figure 2. Target prediction graph. Graph displaying the number of predicted targets from miRWalk for each miRNA differentially expressed between F-BC and NF-BC groups. F-BC, familial breast cancer; NF-BC, non-familial breast cancer. doi:10.1371/journal.pone.0101656.g002

correlated with their corresponding miRs. In other words, if a given miR was upregulated, the expression of its target is expected to be downregulated and vice-versa. From the 31 predicted miR-mRNA interactions, 17 pairs presented inverse fold-change values between F-BC and NF-BC. These results suggested that 17 predicted miR-mRNA interactions could be supported by the potential miRs post-transcription regulator function. Analysis of those miR-mRNA interactions defined a network of 16 genes and 7 miRs whose co-expression is different in F-BC and NF-BC (**Figures 4A and 4B**). Comparing both network profiles, F-BC against NF-BC, we observed different colors of edges representing negative (red) or positive (green) co-expression correlation as well as the different thickness of the edges, where thicker edges indicate high values of co-expression correlation, and thinner edges represent low values of co-expression correlation. We can also visualize that 11 genes from the NF-BC group exhibited downregulation (smaller orange nodes) and 5 genes upregulation (larger orange nodes) compared with the same genes in the F-BC group. On the other hand, we observed 7 miRs (blue nodes) of which miR-98, miR-486-3p, and miR-874 showed low values of co-expression correlation (smaller size of blue nodes) and miR-124, miR-381, miR-501-5p, and miR-660 showed high values of co-expression correlation (bigger size of blue nodes) in F-BC compared with NF-BC network profile.

Out of 49, 8 not predicted miR-mRNA interactions showing inverse correlation (**Table S5**) could also distinguish F-BC from NF-BC tumors. Among them 5 pairs could be considered as predicted targets albeit using less stringent criteria.

From 49 miR-mRNA interactions, 24 (14 predicted and 10 not predicted) showed differentially expressed genes and significant co-expression differences; however, they did not exhibit inverse signal of fold-change value, suggesting that the separation between F-BC from NF-BC tumors could not be exclusively explained by the predominant mechanism of miRs-mediated gene repression.

We performed functional analysis using the IPA (Ingenuity Pathway Analysis; QUIAGEN) program on a set formed by 28 unique genes representing 49 predicted/not predicted miR-mRNA interactions listed in **table S4**. The results from functional analysis demonstrated over representation of some biological processes involved with: apoptosis, cell death, and fibroblast proliferation (**Table S6**).

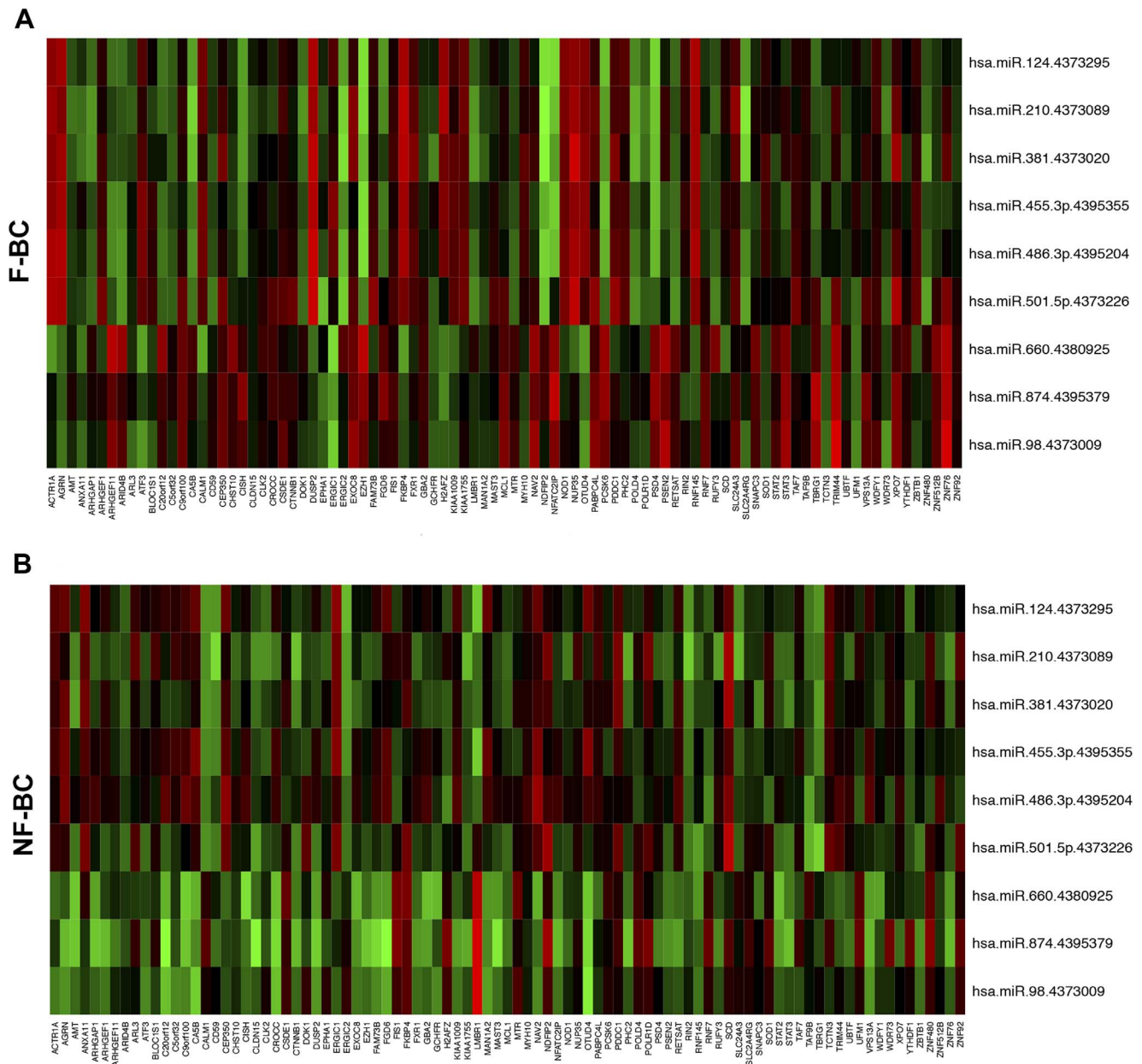


Figure 3. Co-expression matrixes. Co-expression matrixes of the 91 differentially expressed genes vs 9 differentially expressed miRs for F-BC (A) and NF-BC (B), respectively. The colors represent the co-expression values reaching from 1 to -1 for red and green, respectively. F-BC, familial breast cancer; NF-BC, non-familial breast cancer.
 doi:10.1371/journal.pone.0101656.g003

Validation of miRs and targets

The miRs and target-genes validation experiments were performed in a panel of independent samples of sporadic BC ($n=9$), with low risk of displaying BRCA1/2 mutation ($<12\%$) according to *Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm* (BOADICEA) (<http://ccge.medschl.cam.ac.uk/boadicea/>). Due to difficulties in acquisition of new cases of fresh frozen tissues of familial BC cases of young patients, not harboring BRCA1/2 mutation, the set of validation included only 2 new samples totaling 7 samples of F-BC group. All validation set of patients exhibited tumors with luminal subtype. Other clinical and histopathological characteristics were reported in **table S7**.

All 9 miRs were analyzed but the results of qPCR experiments showed the expected upregulation only for miR-124, miR-210, miR-381, miR-455-3p, miR-501-5p, miR-660 and miR-874 down regulation in the F-BC group versus the NF-BC group in accordance to the main results. The small number of samples in the validation experiments might explain the lack of miR-486 and miR-98 validation.

We selected 10 predicted target-genes (**Table S2**) from the network miR–mRNA interactions signature that showed inverse correlation, following **figure 4**, to confirm their inverse expression related to correspondent miR based on fold change values.

Out of 10, 8 target-genes exhibited inverse fold change values with their respectively miRs in agreement with our main results

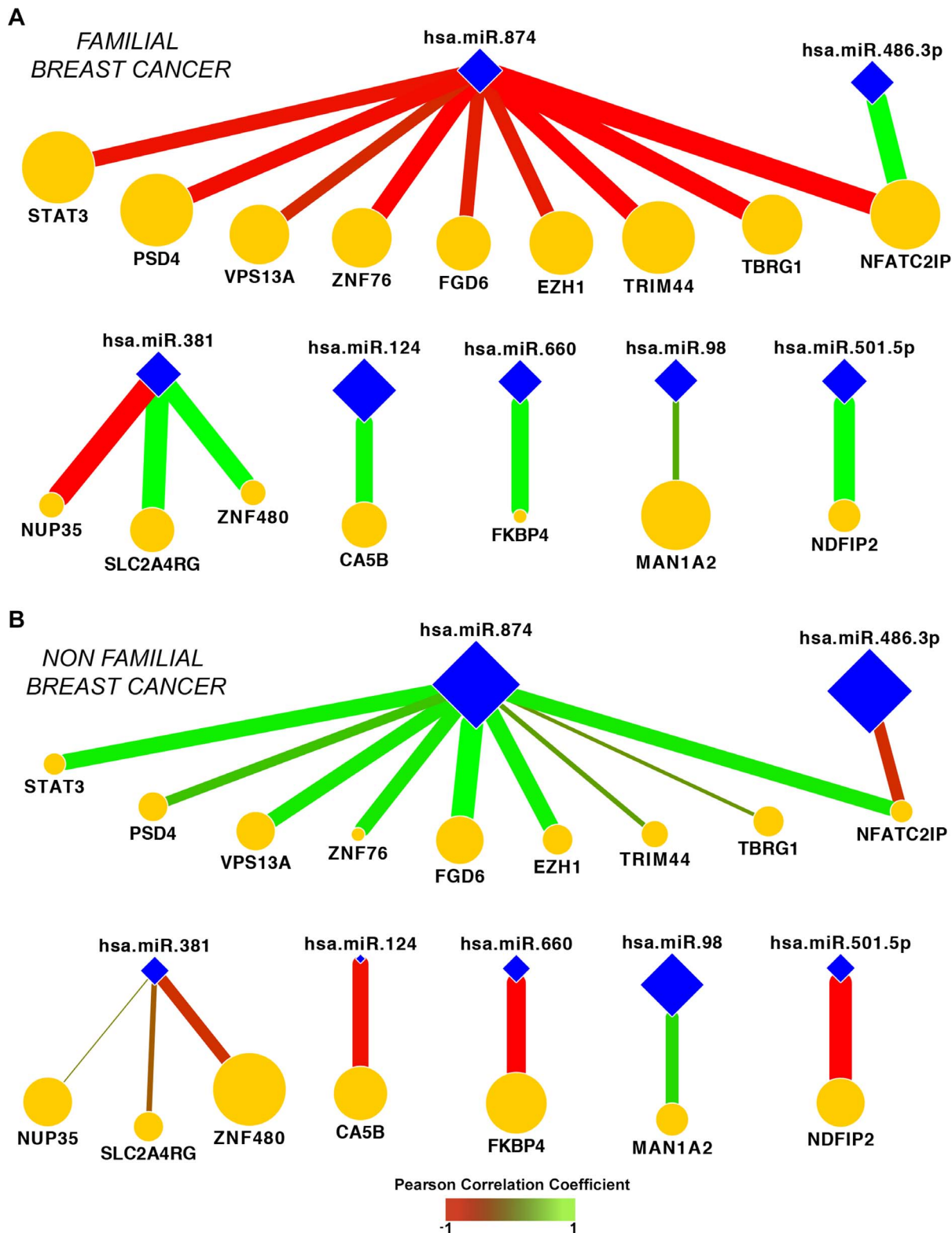


Figure 4. Illustration of network signatures. Seventeen miR-mRNA predicted interactions whose co-expression are significantly different between F-BC (A) and NF-BC (B) groups. Color edges represent positive (green) or negative (red) Pearson correlation values. The edge thickness indicates the magnitude of Pearson correlation values. The node size is proportional to the fold change of genes (orange nodes) and of miRs (blue nodes) between F-BC to NF-BC groups. F-BC, familial breast cancer; NF-BC, non-familial breast cancer.
doi:10.1371/journal.pone.0101656.g004

Table 4. MiR-mRNA interactions validation.

miR-mRNA interaction	Fold miR	Fold mRNA-target	Validated
miR-124:CA5B	87.6	−100.0	Validated
miR-381:ZNF480	10.2	1.29	Not validated
miR-98: MAN1A2	3.68	−2.38	Not validated*
miR-874:STAT3	−2.5	2.97	Validated
miR-874:PSD4	−2.5	2.05	Validated
miR-874:FGD6	−2.5	3.44	Validated
miR-874:EZH1	−2.5	3.78	Validated
miR-874:TRIM 44	−2.5	3.00	Validated
miR-874:TBRG1	−2.5	2.45	Validated
miR-874:NFATC2IP	−2.5	2.16	Validated

*miR-mRNA interaction without agreement with our main results.

doi:10.1371/journal.pone.0101656.t004

(Table 4). This remarkable validation suggested that miR-124, miR-210, miR-381, miR-455-3p, miR-501-5p, miR-660 and miR-874, as well as STAT3, PSD4, SNF480, FGD6, EZH1, TRIM44, TBRG1, NFATC2IP and CA5B target-genes could possibly explain molecular mechanisms involved in BC carcinogenesis that distinguished tumors from familial to sporadic BC in young patients BRCA1/2 non carriers mutations.

Discussion

We present the results of integrated analysis of miR/mRNA data from the same tumor tissue samples to identify genes that could differentiate between tumor harvested from young patients (aged ≤ 35 years) with familial BC and those from sporadic BC, not harboring BRCA1/BRCA2 mutations. We identified a set of 9 miRs whose expression levels, rather than miR identity, were able to correctly separate, with high accuracy, familial and non-familial young BC patients. A subset of these miRs has previously been characterized as BC regulatory genes, including miR-486-3p [36], miR-98 [37], miR-874 [23], miR-210 [24], miR-124 [38,39], whereas miR-660 [40,41] has been associated with other cancers or tissue types.

We next identified a set of miRs showing significant negative or positive correlations with those of their targets. Approximately 34.6% retained inversely correlated miR-mRNA interactions. An interaction network revealed changes in the co-expression of these miR-mRNA pairs that were able to distinguish familial from sporadic breast cancer. For instance, a decreased expression of miR-874, miR-98 and miR-486-3p were associated with increased expression of their predicted target genes in F-BC cases. MiR-874, which has been previously associated with unfavorable prognosis in invasive breast cancer [23] was inversely correlated with several of their paired genes (EZH1, FGD6, PSD4, NFATC2IP, STAT3, TBRG1, TRIM44, VPS13A, ZNF76), suggesting that miR-874 has a critical role in the regulation of genes preferentially expressed in F-BC, compared with the sporadic cases. This analysis revealed genes involved in embryonic stem cell self-renewal, such as STAT3 and EZH1 [42-44]. FGD6 (annexin A2) is a mediator of EGFR endocytosis and its inhibition in BC coincided with an enhanced EGF-signaling [45]. TBRG1 (NIAM) was previously identified as one of the TGF β 1-responsive genes and has been described as a novel growth inhibitor that contributes to the maintenance of chromosomal stability [46]. VPS13A codes for

vacuolar sorting proteins, and its loss was observed in colorectal and gastric cancers with high microsatellite instability [47]. Upregulation of NFATC2IP (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein) can induce the expression of ILs that stimulates T cell proliferation and activation. TRIM44 is a member of tripartite motif-containing protein (TRIM) family, which is an important regulator of carcinogenesis [48].

Contrariwise, upregulated miRs in familial versus sporadic cases were correlated with a reduced expression of their target genes, including CA5B (miR-124), ZNF480, SLC2A4RG, NUP35 (miR-381), NDFIP2 (miR-501-5p), and FKBP4 (miR-660). FKBP4, a binding protein of SSEA-4 is a sialyl-glycolipid that has been commonly used as a pluripotent human embryonic stem cell marker. The inhibition of FKBP4 could reduce the expression of SSEA-4, leading to suppression of cancer malignant processes [49]. SLC2A4R6 is associated with the recruitment of GLUT4 to the plasma membrane and its downregulation may decrease glucose uptake and AKT signaling [50]. CA5B is an enzyme localized in the mitochondrial matrix that converts the CO₂ produced by the TCA cycle to HCO₃[−], which in turn controls metabolic pathways that increase oxidative phosphorylation. A decrease in CA5B levels may lead to a drop in intracellular pH and an activation of the pro-apoptotic protein BAX [51]. Thus, gene profiling in familial BC appears to be associated with some biological processes that seem to characterize a less aggressive behavior compared to the sporadic cases.

Our findings of coordinated expressed pairs between miR and mRNA predicted levels (28.6%) indicated that some miRs, including miR-501-5p, miR-660, miR-874, miR-98, miR-124, and miR-455-3p, act as positive regulators of their target mRNAs. The targets of this population appear to include mainly mRNAs associated with the embryonic development or the nervous system. Several instances of miR co-expression in the same direction as their target genes have been previously reported, albeit this is a less well understood phenomenon [52-54]. We also detected a set of genes that, although presenting positive/negative co-expression, were not included in our list of *in silico* predicted targets, indicating that these genes are not potential miR targets according to our stringent criteria, however, they may be regulated by other mechanisms.

In conclusion, comparing tumors of young patients with or without familial BC history not carriers of BRCA1/2 mutation our

results showed similarity between their phenotypes, most tumors of the present series being of the luminal subtype corroborating previous results [55]. However by applying co-expression analysis we found out transcriptional differences between both groups highlighting that changes in the miR-mRNA regulation were able to distinguish tumors between both groups.

Supporting Information

Table S1 Microarray raw data from GEO accession number GSE37126 showing the correspondent samples ID of the present study. (PDF)

Table S2 Target-genes selected to validation. (PDF)

Table S3 91 differently expressed candidate genes. List of 91 differentially expressed genes associated to at least one miR. (PDF)

Table S4 49 miRNA-mRNA interactions. Interactions presenting significant differences of co-expression profile between F-BC and NF-BC. (PDF)

References

- Brinton LA, Sherman ME, Carreon JD, Anderson WF (2008) Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. *J Natl Cancer Inst* 100: 1643–1648. doi:10.1093/jnci/djn344. PubMed: 19001605
- El Saghir NS, Scoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, et al. (2006) Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer* 20: 6–194. PubMed: 16857060.
- Peng R, Wang S, Shi Y, Liu D, Teng X, et al. (2011) Patients 35 years old or younger with operable breast cancer are more at risk for relapse and survival: a retrospective matched case-control study. *Breast* 20: 568–573. doi:10.1016/j.breast.2011.07.012. PubMed: 21843944
- Han W, Kang SY; Korean Breast Cancer Society (2010) Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 119: 193–200. doi:10.1007/s10549-009-0388-z. PubMed: 19350387
- Paluch-Shimon S, Wolf I, Sadetzki S, Gluck I, Oberman B, et al. (2011) Association between very young age and adverse characteristics of breast cancer at presentation amongst Israeli women. *Am J Clin Oncol* 34: 219–222. doi:10.1097/COC.0b013e3181d6b500. PubMed: 20523208
- Madaras L, Baranyák Z, Kulka J, Szász AM, Kovács A, et al. (2013) Retrospective analysis of clinicopathological characteristics and family history data of early-onset breast cancer: a single-institutional study of hungarian patients. *Pathol Oncol Res* 19: 723–729. doi:10.1007/s12553-013-9635-z. PubMed: 23709114
- Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, et al. (2009) Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One* 4: e7695. doi:10.1371/journal.pone.0007695. PubMed: 19907646
- Cancello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, et al. (2013) Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: How much is "very young"? *Breast* 22: 1046–1051. doi:10.1016/j.breast.2013.08.006. PubMed: 24091127
- Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Fockens JA, et al. (2008) Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol* 26: 3324–3330. doi:10.1200/JCO.2007.14.2471. Erratum in: *J Clin Oncol* 29: 3721. PubMed: 18612148
- Dimitrakakis C, Tsigginou A, Zagouri F, Marinopoulos S, Sergentanis TN, et al. (2013) Breast cancer in women aged 25 years and younger. *Obstet Gynecol* 121: 1235–1240. doi:10.1097/AOG.0b013e318291ef9a. PubMed: 23812457
- Lin CH, Lu YS, Huang CS, Kuo KT, Wang CC, et al. (2011) Prognostic molecular markers in women aged 35 years or younger with breast cancer: is there a difference from the older patients? *J Clin Pathol* 64: 781–787. doi:10.1136/jclinpath-2011-200064. PubMed: 21642658
- Tichy JR, Lim E, Anders CK (2013) Breast cancer in adolescents and young adults: a review with a focus on biology. *J Natl Compr Canc Netw* 11: 1060–1069. PubMed: 24029122.
- Fackenthal JD, Olopade OI (2007) Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7: 937–948. Review. PubMed: 18034184.
- Haffty BG, Choi DH, Goyal S, Silber A, Ranieri K, et al. (2009) Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. *Ann Oncol* 20: 1653–1659. doi:10.1093/annonc/mdp051. PubMed: 19491284
- de Sanjosé S, Léoné M, Berez V, Izquierdo A, Font R, et al. (2003) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int J Cancer* 106: 588–593. PubMed: 12845657.
- Anders CK, Fan C, Parker JS, Carey LA, Blackwell KL, et al. (2011) Breast carcinomas arising at a young age: unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? *J Clin Oncol* 29: e18–20. doi:10.1200/JCO.2010.28.9199. PubMed: 21115855
- Keegan TH, Press DJ, Tao L, Derouen MC, Kurian AW, et al. (2013) Impact of breast cancer subtypes on three-year survival among adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res* 15: R95. PubMed: 24131591.
- Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, et al. (2012) Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 18: 1341–1351. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2599. PubMed: 22261811
- Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Krepsich ACV, et al. (2013) Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PLoS One* 8: e57581. doi:10.1371/journal.pone.0057581. PubMed: 23469205
- Ferracin M, Querzoli P, Calin GA, Negrini M (2011) MicroRNAs: toward the clinic for breast cancer patients. *Semin Oncol* 38: 764–775. doi:10.1053/j.seminoncol.2011.08.005. Review. PubMed: 22082762
- Shi M, Liu D, Duan H, Shen B, Guo N (2010) Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29: 785–99. PubMed: 10.1007/s10555-010-9265-9.
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, et al. (2007) MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 8: R214. PubMed: 17922911.
- Volinia S, Croce CM (2013) Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7413–7417. doi:10.1073/pnas.1304977110. PubMed: 3645522
- Buffa FM, Camps C, Winchester L, Snell CE, Gee HE, et al. (2011) microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Res* 71: 5635–5645. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0489. PubMed: 21737487
- Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, et al. (2008) A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 29: 1963–1966. doi:10.1093/carcin/bgn172. PubMed: 18660546
- Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R (2010) Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* 31: 2124–2126. doi:10.1093/carcin/bgq184. PubMed: 20810544
- Tanic M, Andrés E, M Rodríguez-Pinilla SM, Marquez-Rodas I, Cebollero-Presmanes M, et al. (2013) MicroRNA-based molecular classification of non-

Table S5 miR-mRNA not predicted interactions, presenting inverse correlation. (PDF)

Table S6 Biological processes. Categories over represented by the target genes related to 49 miR-mRNA interactions. (PDF)

Table S7 Patient and tumor characteristics of the validation set. (PDF)

Acknowledgments

We thank Aline Damascena and Leandro Lima (Laboratory, Research Center (CIPE), A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil) for their contribution to the statistical analyses in the initial stages of the project. The authors would like to thank Enago (www.enago.com) for the English language review.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMB HB. Performed the experiments: EPB EHRO. Analyzed the data: EPB CHT ARTS FSP ARP CABP AML RDP HB. Contributed reagents/materials/analysis tools: DMC HB CHT ARTS FSP ARP AML. Wrote the paper: EPB HB MMB.

- BRCA1/2 hereditary breast tumours. *Br J Cancer* 109: 2724–2734. doi:10.1038/bjc.2013.612. PubMed: 24104964
28. Murria Estal R, Palanca Suela S, de Juan Jiménez I, Egoavil Rojas C, García-Casado Z, et al. (2013) MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 142: 19–30. doi:10.1007/s10549-013-2723-7. PubMed: 24129975
 29. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, et al. (2007) The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 13: 2329–2334. PubMed: 17438091.
 30. Wang C, Gao C, Zhuang JL, Ding C, Wang Y (2012) A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol* 138: 2127–2136. doi:10.1007/s00432-012-1288-x. PubMed: 22864815
 31. Smyth GK, Michaud J, Scott HS (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21: 2067–2075. PubMed: 15657102.
 32. Chu GB, Narasimhan R, Tibshirani R, Tusher V (2001) SAM Significance Analysis of Microarrays users guide and technical document. <http://statweb.stanford.edu/~tibs/SAM/>
 33. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, et al. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374–378. PubMed: 12613259.
 34. Browne MW (2000) Cross-Validation Methods. *J Math Psychol* 44: 108–132. PubMed: 10733860.
 35. Silva AR, Grinberg LT, Farfel JM, Diniz BS, Lima LA, et al. (2012) Transcriptional alterations related to neuropathology and clinical manifestation of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7: e48751. doi:10.1371/journal.pone.0048751. PubMed: 23144955
 36. Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, et al. (2011) MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* 71: 4443–4453. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0608. PubMed: 21586611
 37. Siragam V, Rutnam ZJ, Yang W, Fang L, Luo L, et al. (2012) MicroRNA miR-98 inhibits tumor angiogenesis and invasion by targeting activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11. *Oncotarget* 3: 1370–1385. PubMed: 23211491.
 38. Liang YJ, Wang QY, Zhou CX, Yin QQ, He M, et al. (2013) MiR-124 targets Slug to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Carcinogenesis* 34: 713–722. doi:10.1093/carcin/bgs383. PubMed: 23250910
 39. Lv XB, Jiao Y, Qing Y, Hu H, Cui X, et al. (2011) miR-124 suppresses multiple steps of breast cancer metastasis by targeting a cohort of pro-metastatic genes in vitro. *Chin J Cancer* 30: 821–830. doi:10.5732/cjc.011.10289. PubMed: 22085528
 40. Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, et al. (2013) Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics* 14: 265. doi:10.1186/1471-2164-14-265. PubMed: 23597168
 41. Yoshitaka T, Kawai A, Miyaki S, Numoto K, Kikuta K, et al. (2013) Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J Orthop Res* 31: 1992–1998. doi:10.1002/jor.22457. PubMed: 23940002
 42. Liu S, Patel SH, Ginestier C, Ibarra I, Martin-Trevino R, et al. (2012) MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells. *PLoS Genet* 8: e1002751. doi:10.1371/journal.pgen.1002751. PubMed: 22685420
 43. Lieblein JC, Ball S, Hutzen B, Sasser AK, Lin HJ, et al. (2008) STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer* 8: 302. doi:10.1186/1471-2407-8-302. PubMed: 18939993
 44. Wagner KU, Schmidt JW (2011) The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer. *J Carcinog* 10: 32. doi:10.4103/1477-3163.90677. PubMed: 22279417
 45. de Graauw M, Cao L, Winkel L, van Miltenburg MH, le Dévédec SE, et al. (2013) Annexin A2 depletion delays EGFR endocytic trafficking via cofilin activation and enhances EGFR signaling and metastasis formation. *Oncogene*: In press. doi: 10.1038/onc.2013.219. PubMed: 23792445
 46. Tompkins VS, Hagen J, Frazier AA, Lushnikova T, Fitzgerald MP, et al. (2007) A novel nuclear interactor of ARF and MDM2 (NIAM) that maintains chromosomal stability. *J Biol Chem* 282: 1322–1333. PubMed: 17110379.
 47. An CH, Kim YR, Kim HS, Kim SS, Yoo NJ, et al. (2012) Frameshift mutations of vacuolar protein sorting genes in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *Hum Pathol* 43: 40–47. doi:10.1016/j.hum-path.2010.03.015. PubMed: 21733561
 48. Kashimoto K, Komatsu S, Ichikawa D, Arita T, Konishi H, et al. (2012) Overexpression of TRIM44 contributes to malignant outcome in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 103: 2021–2026. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02407.x. PubMed: 22862969
 49. Hung TC, Lin CW, Hsu TL, Wu CY, Wong CH (2013) Investigation of SSEA-4 binding protein in breast cancer cells. *J Am Chem Soc* 135: 5934–5937. doi:10.1021/ja312210c. PubMed: 23574147
 50. Garrido P, Morán J, Alonso A, González S, González C (2013) 17 β -estradiol activates glucose uptake via GLUT4 translocation and PI3K/Akt signaling pathway in MCF-7 cells. *Endocrinology* 154: 1979–1989. doi: 10.1210/en.2012-1558. PubMed: 23546602
 51. Pellegrini L, Pucci B, Villanova L, Marino ML, Marfe G, et al. (2012) SIRT3 protects from hypoxia and staurosporine-mediated cell death by maintaining mitochondrial membrane potential and intracellular pH. *Cell Death Differ* 19: 1815–1825. doi:10.1038/cdd.2012.62. PubMed: 22595756
 52. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931–1934. PubMed: 18048652.
 53. Nunez-Iglesias J, Liu CC, Morgan TE, Finch CE, Zhou XJ (2010) Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One* 5: e8898. doi:10.1371/journal.pone.0008898. PubMed: 20126538
 54. Hannafon BN, Sebastiani P, de las Morenas A, Lu J, Rosenberg CL (2011) Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 13: R24. doi:10.1186/bcr2839. PubMed: 21375733
 55. Fernandez-Ramires R, Gómez G, Muñoz-Repeto I, de Cecco L, Lloret G, et al. (2011) Transcription characteristics of familial non-BRCA1/BRCA2 breast tumors. *Int J Cancer* 128: 2635–2644. doi: 10.1002/ijc.25603. PubMed:20715112