



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

DANIEL RODRIGUES DE BASTOS

**Análise da expressão de miR-10b e miR-7 potencialmente
associados à expressão de BRCA1 em carcinomas de mama**

Goiânia
2017

DANIEL RODRIGUES DE BASTOS

Análise da expressão de miR-10b e miR-7 potencialmente associados à expressão de BRCA1 em carcinomas de mama

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde – nível mestrado da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Área de Concentração: Ambiente e Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Aparecida Saddi.

Co-orientador: Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa

Goiânia

2017

B327a Bastos, Daniel Rodrigues de

Análise da expressão de miR-10b e miR-7 potencialmente associados à expressão de BRCA1 em carcinomas de mama [manuscrito]/ Daniel Rodrigues de Bastos.-- 2017.

113 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2017.

Inclui referências f.81-92

1. Mamas - Câncer - Prognóstico - Goiás (Estado) - Análise. I.Saddi, Vera Aparecida. II.Costa, Cesar Augusto Sam Tiago Vila-Nova. III.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. IV. Título.

CDU: 616-006.6(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 04 DE MAIO DE 2017 E CONSIDERADA
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Vera Aparecida Saddy

Profa. Dra. Vera Aparecida Saddy / PUC Goiás (Presidente/Orientadora)

2) Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa

Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa / PUC Goiás (Co-Orientador)

3) Megmar Aparecida dos Santos Carneiro

Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro / UFG (Membro Externo)

4)

Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva
Prof. Dr. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás (Membro)

5)

Flávia Melo Rodrigues
Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Beraldo de Bastos e Maria Das Dores Rodrigues de Azevedo Bastos, responsáveis por minha formação pessoal e humanística fundamentada pelos princípios morais e éticos.

Aos meus irmãos, Jéssica Rodrigues de Bastos e Marcos Antônio Rodrigues de Bastos, pelos incessantes ensinamentos que me alicerçam.

Ao publicitário André Henrique Azeredo Cavalini por lembrar-me a simplicidade e amor ao próximo, auxiliar-me à reforma íntima e em grandes edificações pessoais.

Aos amigos por críticas construtivas, companheirismo, amor e fé, especialmente a Antônio Luis, Daiane de Oliveira, Douglas Gomes dos Santos, Edson Marques, Jackson Gomes da Silva, Harthur Sued, Jéssica Cáceres Martins e Nilton Reis.

Aos amigos que se distanciaram pelas circunstâncias do tempo, e que lhes devoto, dia após dia, carinho absoluto e ardente desejo de paz, desde as mínimas lembranças, aos intensos pensamentos, em especial a Bruno Alves Rodrigues, Fernando Rodrigues de Bastos e Yully Modesto.

Ao pianista Elider de Paula Bento por ter me proporcionado novas visões do cotidiano a partir dos sons.

A todos (as) professores (as) que direta ou indiretamente participaram do meu construto socioeducacional, em especial à Prof.^a Elga de Fátima Almeida, da disciplina de biologia, ministrada no Colégio Estadual Professor Alcide Jubé da Cidade de Goiás, por seu protagonismo em despertar-me para o campo das ciências biológicas por meio de seu amor no ensino e integral interesse no aprendizado de seus alunos.

Ao Prof. Nelson Jorge da Silva Jr. pela confiança no exercício da minha profissão, por sua amizade e por todo investimento pessoal e profissional.

À Prof.^a Vera Aparecida Saddi, protagonista em estimular-me em pesquisas no campo da biologia molecular, por seus ensinamentos incansáveis e sua dedicação à formação de discentes amparados por seu profissionalismo ético.

Ao Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, pelo apoio científico, técnico e grandioso relacionamento interpessoal.

À médica patologista Juliana Paes pelo companheirismo e por seus singelos sorrisos, os quais me trouxeram paz em dias difíceis.

Ao Prof. Antônio Marcio Cordeiro por seu amor aos estudos e seu método de ensino capaz de motivar o mais apático dos acadêmicos.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, por proporcionar conhecimento ímpar em minha formação pessoal e profissional.

Aos colegas e amigos de trabalho lotados na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, por contribuições visionárias e momentos singulares.

Aos leitores das minhas construções poéticas e devaneios pelas prosas, devotando carinho especial à Profa. Rosane Maria Isaac, leitora e crítica desta minha pequenez.

Ao Hospital Araújo Jorge, em especial ao colaborador Ricardo Henrique Silva, por sua destreza, impecabilidade em resolução de situações corriqueiras e seus estimados valores morais e éticos.

Às mulheres e homens de todo o mundo, principalmente às vítimas de doenças devastadoras e tão mutiladoras quanto o câncer. Não havendo a humanidade a capacidade de suprimir tais malignidades, resta-nos pesquisar incessantemente, a

fim de subsidiar mais e mais pesquisas para que um dia a doença seja mera passagem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo apoio financeiro no desenvolvimento do estudo.

À Naturae, pelo financiamento integral das parcelas do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde – nível mestrado da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

À Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), devido ao auxílio à equipe de pesquisa.

Aos membros da equipe desta pesquisa, que viabilizaram e contribuíram para exequibilidade de cada etapa da proposta, atribuindo afeição especial à Jéssica E. P. Ramos e Raphael Bessa Parmigiani.

À vida e as oportunidades que com ela chegaram, aos erros que permitiram o aprendizado e aos acertos que trouxeram paz.

Às pedras - em seu sentido metafórico - responsáveis por grandes lapidações e enormes estimuladoras à reflexão interna.

"Prezado Professor, sou sobrevivente de um campo de concentração. Meus olhos viram o que nenhum homem deveria ver. Câmaras de gás construídas por engenheiros formados. Crianças envenenadas por médicos diplomados. Recém-nascidos mortos por enfermeiras treinadas. Mulheres e bebês fuzilados e queimados por graduados de colégios e universidades. Assim, tenho minhas suspeitas sobre a Educação. Meu pedido é: ajude seus alunos a tornarem-se humanos. Seus esforços nunca deverão produzir monstros treinados ou psicopatas hábeis. Ler, escrever e aritmética só são importantes se fizerem nossas crianças mais humanas."

Suposta carta encontrada em campos de concentração nazista após Segunda Guerra Mundial.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres de todo o mundo e representa a principal causa de morte nesta população. Importantes biomarcadores têm sido estudados, a fim de definir melhor o prognóstico de pacientes acometidas por esta doença. Os microRNAs são pequenas moléculas de RNAs não codificantes, compostos por 21 a 25 nucleotídeos e desempenham importante papel na regulação pós-transcricional de diversos genes. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar a expressão de microRNAs (miRNAs: hsa-miR-7 e hsa-miR-10b) e da proteína BRCA1 em amostras de câncer de mama, bem como as possíveis associações entre a expressão desses marcadores e os aspectos clinicopatológicos e prognósticos. **Método:** O estudo foi composto por 92 casos de carcinoma de mama, provenientes do Hospital Araújo Jorge, da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Foram utilizados fragmentos de tumores incluídos em parafina. A extração de microRNA das amostras foi realizada e o produto gerado foi utilizado para a síntese de cDNA. As amostras de cDNA foram ajustadas para igual concentração e submetidas à PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). As amostras foram avaliadas ainda por meio de imuno-histoquímica para expressão de BRCA1. **Resultados:** Um total de 234 registros de imuno-histoquímica foi avaliado, resultando em 56 casos de carcinomas de mama apresentando fenótipo não triplo-negativo e 36 com fenótipo triplo-negativo. A sobrevida das pacientes em função das características clinicopatológicas demonstrou associações com os casos triplo-negativos ($p=0,044$), estádios mais avançados ($p=0,005$), acometimento linfonodal ($p=0,038$), presença de metástase à distância ($p=0,0008$) e ausência da expressão de BRCA1 ($p=0,039$). Associações significativas foram demonstradas entre a ausência de BRCA1 e o fenótipo triplo-negativo ($p=0,0346$), entre a ausência da expressão do receptor de estrógeno e ausência da expressão de BRCA1 ($p=0,006$), e entre o receptor de progesterona e a ausência da expressão de BRCA1 ($p=0,0163$). A análise por qRT-PCR demonstrou diferentes níveis de expressão de miR-10b e de miR-7, com associações significativas ao fenótipo triplo-negativo ($p=0,021$; $p=0,042$) e à ausência de BRCA1 ($p=0,039$; $p=0,006$). A comparação entre ausência e presença da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano demonstrou diferença significativa para miR-7 ($p=0,031$), sendo que a expressão de miR-10b nestes casos não foi estatisticamente diferente ($p=0,926$). **Conclusão:** Associações significativas foram demonstradas entre a ausência de BRCA1 e o fenótipo triplo-negativo. A sobrevida em cinco anos foi inversamente associada ao fenótipo triplo-negativo, aos estádios clínicos III e IV, à presença de metástase linfonodal, à presença de metástase à distância e à ausência da expressão de BRCA1. Este estudo demonstrou ainda que hsa-miR-7 e hsa-miR-10b estão significativamente associados à ausência da expressão de BRCA1 e ao fenótipo triplo-negativo, sendo observada pior sobrevida nestes perfis de pacientes. Estudos com maior número de casos e com linhagens celulares devem ser realizados para constatar o papel de hsa-miR-7 e hsa-miR-10b na modulação da expressão de BRCA1.

Palavras chave: microRNA, hsa-miR-7, hsa-miR-10b, carcinoma de mama, BRCA1.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most frequent neoplasm among women worldwide and represents the leading cause of death in this population. Important biomarkers have been studied in order to better define the prognosis of patients affected by this cancer. MicroRNAs are small molecules of non-coding RNAs composed of 21 to 25 nucleotides that play an important role in the post-transcriptional regulation of several genes. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the expression of microRNAs (miRNAs: hsa-miR-7 and hsa-miR-10b) and BRCA1 protein in breast cancer samples, as well as the possible associations between expression of these markers with clinicopathological and prognostic aspects. **Method:** The study included 92 cases of breast carcinoma from Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Formalin fixed paraffin embedded samples were used for the analysis. MicroRNA was extracted from the samples and used for cDNA synthesis. The cDNA samples were adjusted to the same concentration and submitted to quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Samples were further evaluated by immunohistochemistry for BRCA1 expression. **Results:** From a group of 234 immunohistochemical records, 56 cases of non-triple-negative and 36 triple-negative breast carcinomas were selected. Five-year overall survival was significantly associated to triple negative phenotype ($p = 0.044$), advanced stages ($p = 0.005$), lymph node involvement ($p = 0.038$), presence of distant metastasis ($p = 0, 0008$) and absence of BRCA1 expression ($p = 0.039$). Significant associations were demonstrated between the absence of BRCA1 and the triple-negative phenotype ($p = 0.0346$), as well as the absence of estrogen receptor expression ($p = 0.006$) and absence of progesterone receptor expression ($p = 0.0163$). The analysis by qRT-PCR demonstrated different levels of miR-10b and miR-7 expression in the tumors, with significant associations with triple-negative phenotype ($p = 0.021$, $p = 0.042$) and the absence of BRCA1 ($p = 0.039$, $p = 0.006$). The comparison between absence and presence of human epidermal growth factor receptor expression showed a significant difference for miR-7 ($p = 0.031$), and the expression of miR-10b in these cases was not statistically different ($p = 0.926$). **Conclusion:** Significant associations were demonstrated between the absence of BRCA1 and the triple-negative phenotype. Five-year overall survival was reduced for the triple-negative phenotype patients, clinical stages III and IV, the presence of lymph node metastasis, the presence of distant metastasis and the absence of BRCA1 expression. This study also demonstrated that hsa-miR-7 and hsa-miR-10b are significantly associated with the absence of BRCA1 expression and triple-negative phenotype, with poorer survival in these patient profiles. Studies with more cases and with cell lines should be performed in order to confirm the role of hsa-miR-7 and hsa-miR-10b in the modulation of BRCA1 expression.

Key words: microRNA, hsa-miR-7, hsa-miR -10b, breast carcinoma, BRCA1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento embrionário da mama: Estádios da formação do tecido glandular e do sistema de canais lactíferos a partir da ectoderme. A: espessamento ectodérmico primitivo; B: o espessamento ectodérmico envia para a mesoderme cordões celulares na semana 12; C, D: os cordões canalizam para formar os canais lactíferos, estando nesta fase a papila futura escavada. Fonte: Adaptado de BERNARDES (2011).....	19
Figura 2. Esquemas representando o desenvolvimento das glândulas mamárias. A, aspecto ventral de um embrião com cerca de 28 dias, mostrando as cristas mamárias. B, Aspecto semelhante, com 6 semanas, mostrando o remanescente destas cristas. C, Corte transversal de uma crista mamária no local onde a glândula mamária esta se desenvolvendo. D a F, Cortes semelhantes mostrando estágios sucessivos do desenvolvimento da mama entre a 12 ^a semana e o nascimento. Fonte: MOORE; PERSAUD (2008).....	20
Figura 3. Visão anatômica da mama. 1) Vista anterior. 2) Vista lateral.....	21
Figura 4. Estrutura anatômica da mama feminina.....	22
Figura 5. Linfonodos mamários.....	23
Figura 6. Sub-localização anatômica. A) Quadrante superior externo; B) Quadrante superior interno; C) Quadrante inferior externo; D) Quadrante inferior interno; E) Mamilo; F) Porção central; G) Prolongamento axilar.....	23
Figura 7. Número estimado de mortes em mulheres de todo o mundo (10 principais sítios de câncer), em 2012.	24
Figura 8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.	25
Figura 9. Características do câncer. Esta ilustração abrange as seis principais características do câncer originalmente propostas por Hanahan e WeinBerg.	31
Figura 10. Classificação molecular do câncer de mama. Apresentação dos quatro subtipos mais conhecidos (Luminal A e B, HER+ e Basal) com acréscimo dos dois mais novos e de intensa discussão (Claudina baixo e normal-like).	34
Figura 11. Ativação de BRCA1. O desenho esquematiza a ativação de BRCA1 por meio da fosforilação promovida por ATM e Chk2. Após fosforilação, BRCA1 liga-se a outras proteínas, formando um complexo de proteínas, que atuará sobre a molécula de DNA lesionada, promovendo reparo. Em asterisco, proteínas frequentemente	

mutadas em câncer de mama e câncer de ovário. Fonte: Adaptado de LI; GREENBERG (2012).	40
Figura 12. Organização genômica de genes de microRNAs.	43
Figura 13. Biossíntese de microRNA.	44
Figura 14. Fluxograma da seleção dos casos analisados.	61
Figura 15. Fluxograma da seleção de casos para o estudo.	62
Figura 16. Análise de sobrevida global em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	67
Figura 17. Análise de sobrevida em 60 meses em função do fenótipo tumoral de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	68
Figura 18. Análise de sobrevida em 60 meses em função da idade para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	68
Figura 19. Análise de sobrevida em 60 meses em função do estadiamento clínico para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	69
Figura 20. Análise de sobrevida em 60 meses em função do acometimento linfonodal para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	70
Figura 21. Análise de sobrevida em 60 meses em função do desenvolvimento de metástase à distância para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO. M0: Sem metástase; M1: Com metástase.	71
Figura 22. Análise de sobrevida em 60 meses em função da expressão de BRCA1 para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	71
Figura 23. Comparação da expressão de miR-7 e miR-10b em função do fenótipo tumoral para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	72
Figura 24. Comparação da expressão de miR-7 e miR-10b em função da expressão de BRCA1 para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	73
Figura 25. Comparação da expressão de miR-7 e miR-10b em função da expressão de HER2 para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores prognósticos em câncer de mama (FITZGIBBONS et al., 2000)..	35
Tabela 2. MicroRNAs e seus alvos em câncer de mama. Adaptado de O'DAY; LAL (2010).....	46
Tabela 3. Localização e sequência gênica de hsa-miR-10b e hsa-miR-7.....	48
Tabela 4. Alguns estudos que avaliaram a expressão de miR-10b e miR-7 em câncer de mama.	49
Tabela 5. Análise descritiva das características sociodemográficas das mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.	63
Tabela 6. Aspectos clinicopatológicos de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama em função dos fenótipos TN e NTN, no ano de 2006 e 2007, em Goiânia-GO.....	64
Tabela 7. Avaliação da expressão de BRCA1 parâmetros clinicopatológicos de mulheres diagnosticadas com carcinoma mama entre 2006 e 2007 em Goiânia-GO.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores de Risco para o câncer de mama.....	27
Quadro 2. Grupamento por estádios.	30

LISTA DE SIGLAS

AGO2	Argonauta 2
ACCG	Associação de Combate ao Câncer de Goiás
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATM	Do inglês, <i>serine/threonine kinase</i>
BRCA1	Do inglês, <i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	Do inglês, <i>Breast Cancer 2</i>
CDH1	Do inglês, <i>cadherin 1</i>
cDNA	DNA complementar
c-ERB-2	Do inglês, <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
CHEK2	Do inglês, <i>Checkpoint Kinase 2</i>
c-MYC	Do inglês, <i>proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
CpG	Ilhas CpG (Citosina, Guanina)
cTNM	TNM clínico
DGCR8	Do inglês, <i>DiGeorge syndrome critical region in gene 8</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>
ER β	Do inglês, <i>estrogen receptor 2</i>
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
GW	Do inglês, <i>gawky</i>
HSA-MIR-7	Do inglês, <i>Homo sapiens microRNA 7</i>
HSA-MIR-10B	Do inglês, <i>Homo sapiens microRNA 10b</i>
HAJ	Hospital Araújo Jorge
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (Do inglês: <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IHQ	Imuno-histoquímica
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INT-2	Do inglês, <i>fibroblast growth factor 3</i>
iRNA	RNA de interferência
Ki-67	Do inglês, <i>marker of proliferation Ki-67</i>

Lin-14	Do inglês, <i>Protein lin-14</i>
MIB-1	Do inglês, <i>mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
miRNA	microRNA
miR-7	microRNA-7
miR-10b	microRNA-10b
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	Pequenos RNAs não codificantes
NEU	Do inglês, <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
NR	Não Relatado
NTN	Não triplo-negativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	Proteína 53
PALB2	Do inglês, <i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTEN	Do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
pTNM	TNM patológico
Pri-miRNA	microRNA primário
qPCR	PCR quantitativa
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real
RAD51C	Do inglês, <i>S. cerevisiae, homolog of C</i>
RAS	Do inglês, <i>proto-oncogene, GTPase</i>
RCPATH UK	Do inglês, <i>Royal College of Pathologists United Kingdom</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RISC	Do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNU6	Do inglês, <i>RNA, U6 small nuclear</i>
RP	Receptor de Progesterona
RR	Risco Relativo
rRNA	RNA ribossomal
SCN	Sistema de Classificação de Nottingham
snRNA	pequenos RNAs nucleares
SUS	Sistema Único de Saúde
TN	Triplo-negativo

TNM	Tumor Linfonodo Metástase (Sistema de estadiamento TNM)
tRNA	RNA transportador
UTR	Região não traduzida (do inglês: <i>untranslated region</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1.1. Embriologia do tecido mamário	19
1.1.2. Anatomia	21
1.1.3. Sub-localização anatômica	23
1.1.4. Epidemiologia	24
1.1.5. Fatores de Risco.....	26
1.1.6. Estadiamento.....	30
1.2. CARCINOGENESE MAMÁRIA	30
1.2.1. Subtipos Moleculares	33
1.2.2. Fatores prognósticos	35
1.2.3. Diagnóstico e tratamento.....	37
1.2.4. BRCA1.....	38
1.2.5. MicroRNAs	41
2. JUSTIFICATIVA.....	52
3. OBJETIVOS	54
3.1. Objetivo Geral	54
3.2. Objetivos específicos	54
4. METODOLOGIA	55
4.1. Aspectos éticos	55
4.2. Delineamento metodológico	55
4.3. Elegibilidade das participantes da pesquisa e coleta de dados clínico-epidemiológico	55
4.4. Critérios de inclusão.....	56
4.5. Seleção dos microRNAs	56
4.6. Análise imuno-histoquímica	56

4.7. Análise molecular	57
4.7.1. Extração de RNA	57
4.7.2. Síntese de cDNA	58
4.7.3. PCR em tempo real	58
4.8. Análise de dados	59
5. RESULTADOS	62
5.1. Característica da amostra	62
5.2. Características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com carcinoma de mama.....	63
5.3. Expressão de BRCA1 e Características clinicopatológicas	65
5.4. Aspectos Prognósticos: Análise de sobrevida.....	67
5.5. Expressão de mir-10b e mir-7	72
6. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS	81
ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO TNM CLÍNICO.....	93
ANEXO B – CLASIFICAÇÃO TNM PATOLÓGICO.....	95
ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO ÉTICO DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE	97
ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO ÉTICO DA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE.....	102
ANEXO E - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE MICRORNAS	105
ANEXO F - PROTOCOLO TRANSCRIÇÃO REVERSA	107
ANEXO G – PCR EM TEMPO REAL	108
APÊNDICE A – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS ..	109

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma neoplasia frequente e acomete mulheres em todo o mundo, podendo ocorrer também em homens, mas em proporção mínima. Estatísticas demonstram que o carcinoma mamário representa a principal causa de morte na população feminina (IARC, 2016). No Brasil, o câncer de mama responde por 25% do total dos novos casos a cada ano, sendo estimados 57.960 novos casos em 2016, e um risco aproximado de 56,20 novos casos a cada 100 mil mulheres. No Estado de Goiás, as estatísticas estimaram 1.680 novos casos de câncer de mama em 2016. Em Goiânia, foram previstos 250 novos casos de câncer de mama e a cada 100 mil habitantes o risco foi de aproximadamente 76,07 (INCA, 2016).

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea e apresenta respostas individuais distintas quanto ao tratamento e prognóstico (MAXWELL, 2010). As variações moleculares contribuem para a individualização das características que conferem ao tecido tumoral diferenças de comportamento e de resposta aos tratamentos usuais (BERSE; LYNCH, 2015). Baseado em marcadores moleculares, o câncer de mama é classificado em quatro principais subtipos: Luminal A e B, que expressam receptores hormonais (receptor de estrógeno e receptor de progesterona); HER2+ que apresenta alta expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano; e o subtipo *basal-like*, comumente representado por tumores com ausência da expressão de receptores hormonais e de HER2, denominados triplo-negativos. Dois outros subtipos são descritos na literatura: claudina baixa e normal-like, embora ainda sejam alvos de intensa discussão (PEROU et al., 2000; VIJVER et al., 2002; HU et al., 2006; SANDHU et al., 2010).

Alterações genéticas relacionadas aos carcinomas de mama e de ovário têm sido descritas por inúmeros autores e dentre estas destacam-se as mutações do gene *BRCA1* (HARADA et al., 2013; LIU et al., 2016; SHI. et al., 2017). As principais funções associadas a este gene incluem o reparo de lesões na molécula de DNA, a regulação do ciclo celular e a regulação transcricional de diversos genes (FELICIO et al., 2016). Além de mutações pontuais que levam à deficiência da proteína BRCA1,

estudos demonstram o papel da metilação em ilhas CpG na região promotora de BRCA1, que impede o reconhecimento e a ligação de fatores de transcrição, resultando no silenciamento gênico (WU et al., 2016). Além disso, a ação de microRNAs que interferem com os transcritos de BRCA1, silenciando o gene de forma pós-transcricional, tem sido investigada nos tumores de mama (RAYCHAUDHURI et al., 2017).

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNAs não-codificantes de cadeia simples, contendo em média 22 nucleotídeos, e atuam no citoplasma celular onde ligam-se à extremidade 3' não-traduzida da molécula de RNA mensageiro alvo, induzindo sua degradação ou a repressão da tradução (MEDIMEGH et al., 2014). A atividade dos microRNAs é de fundamental importância em processos biológicos, pois atuam no controle do crescimento, diferenciação e desenvolvimento das células e tecidos (MAO et al., 2014). Em virtude de sua ampla função na manutenção de processos fisiológicos, estudos atuais demonstram que a hipoexpressão ou hiperexpressão de microRNAs está associada a diversas doenças, incluindo o câncer (DANZA et al., 2014; LU et al., 2014; KNIRSH et al., 2016; M'HAMED et al., 2017)

Uma pesquisa no banco de dados miRBase, realizada em 16 de fevereiro de 2017, revelou 1.881 precursores de microRNAs e 2.588 miRNAs maduros já descritos para *Homo sapiens* (MIRBASE, 2017). Estima-se que os microRNAs estejam envolvidos na regulação de mais de um terço dos genes humanos, dentre eles o *BRCA1* (O'DAY; LAL, 2010; CHANG; SHARAN, 2012; MASUDA et al., 2012.; OKUDA et al., 2013; HUYNH; JONES et al., 2014; KALNIETE et al., 2015; SHI et al., 2015; WANG et al., 2016; M'HAMED et al., 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de hsa-miR-10b e hsa-miR-7, dois microRNAs potencialmente associados à regulação da expressão de BRCA1, em câncer de mama (O'DAY; LAL, 2010; M'HAMED et al., 2017).

A hipótese do estudo é que a expressão de miR-10b e miR-7 esteja relacionada à regulação negativa da expressão de BRCA1 que, por sua vez, encontra-se significativamente associada ao comportamento mais agressivo dos carcinomas de mama, conferindo pior prognóstico às pacientes.

1.1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1. EMBRIOLOGIA DO TECIDO MAMÁRIO

As mamas femininas, derivadas de glândulas sudoríparas apócrinas, são estruturas pares com função principal de lactação (BERG et al., 2006). O desenvolvimento é iniciado na quinta semana do período embrionário a partir do espessamento compacto da ectoderme da parede torácica anterior, formando cristas mamárias primitivas visíveis entre a sétima e oitava semana (Figura 1) (GOSS, 1997; MOORE; PERSAUD, 2008; GUYTON; HALL, 2011).

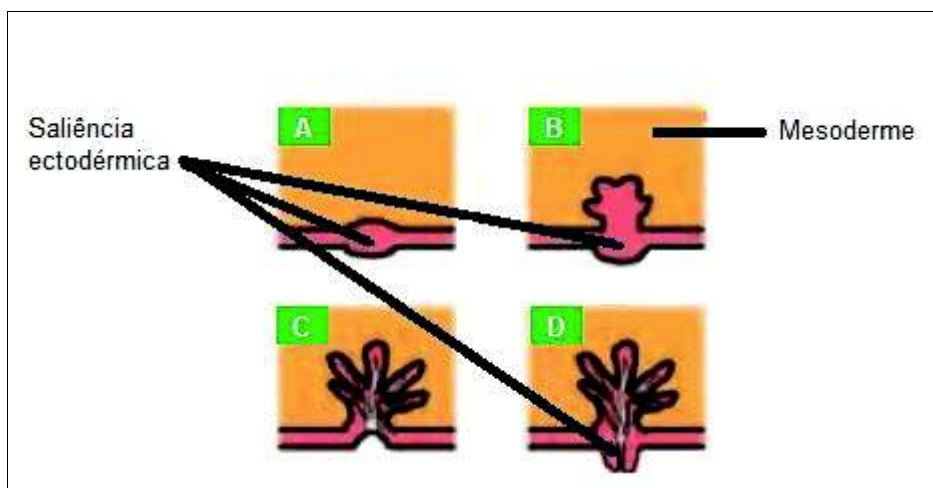


Figura 1. Desenvolvimento embrionário da mama: Estádios da formação do tecido glandular e do sistema de canais lactíferos a partir da ectoderme. **A:** espessamento ectodérmico primitivo; **B:** o espessamento ectodérmico envia para a mesoderme cordões celulares na semana 12; **C, D:** os cordões canalizam para formar os canais lactíferos, estando nesta fase a papila futura escavada. **Fonte:** Adaptado de BERNARDES (2011).

Por volta da sétima e oitava semana, ocorre a invaginação do mesênquima da parede torácica. Os ramos epiteliais ramificam na décima sexta semana de gestação (BERG et al., 2006). A formação dos ductos mamários é estimulada por ação de hormônios sexuais placentários que induzem as gemas epiteliais a se canalizarem. Os lóbulos mamários se diferenciam entre a trigésima segunda e quadragésima semana de vida intrauterina (Figura 2) (GOSS, 1997).

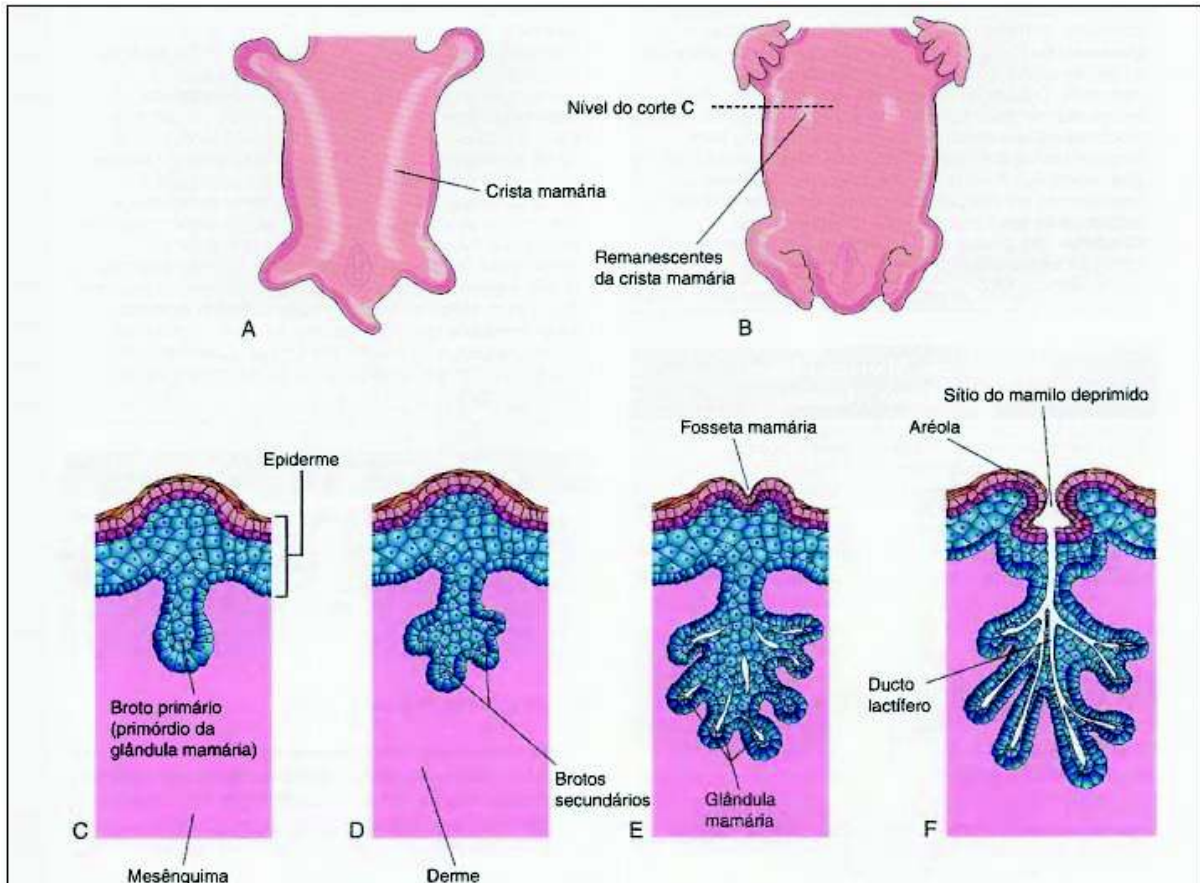


Figura 2. Esquemas representando o desenvolvimento das glândulas mamárias. **A**, aspecto ventral de um embrião com cerca de 28 dias, mostrando as cristas mamárias. **B**, Aspecto semelhante, com 6 semanas, mostrando o remanescente destas cristas. **C**, Corte transversal de uma crista mamária no local onde a glândula mamária está se desenvolvendo. **D a F**, Cortes semelhantes mostrando estágios sucessivos do desenvolvimento da mama entre a 12^a semana e o nascimento. **Fonte:** MOORE; PERSAUD (2008).

O desenvolvimento das mamas estabiliza-se após o período da puberdade em função da ação de estrogênio e progesterona provenientes do ciclo menstrual. Este período é marcado pelo acúmulo de gordura associada, aumento de tecido conjuntivo, e desenvolvimento dos lóbulos e alvéolos. Com a concepção e aumento dos níveis de prolactina as mamas voltam a ser estimuladas e atingem sua completa capacidade funcional, quando as células mamárias alcançam seu maior potencial de diferenciação (MOORE; PERSAUD, 2008; GUYTON; HALL, 2011). Quanto maior for o grau de diferenciação celular, menor será a capacidade do genoma recuperar-se de eventuais mutações. Por outro lado, as chances de uma transformação maligna reduzem significativamente devido ao mecanismo de apoptose. Após a menopausa,

as células do tecido mamário realizam o processo denominado de involução e tornam-se menos susceptíveis ao câncer (CHUFFA et al., 2017).

1.1.2. ANATOMIA

As mamas estão localizadas ventralmente aos músculos do grande peitoral e serratus anterior na altura do intervalo que compreende a terceira e sétima costelas, entre a linha médioesternal e linha axilar anterior (Figura 3) (SOBOTTA, 2000; BERNARDES, 2011).

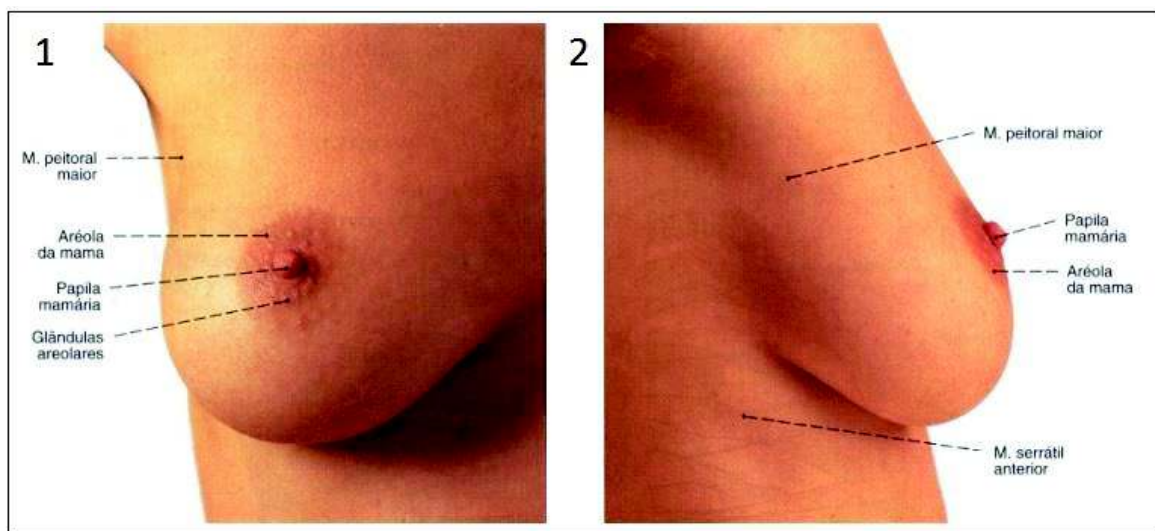


Figura 3. Visão anatômica da mama. 1) Vista anterior. 2) Vista lateral.
Fonte: Adaptado de SOBOTTA (2000).

A ação dos hormônios sexuais, pós-puberdade, confere aumento das mamas a partir da proliferação celular do tecido glandular, adiposo e conectivo, alcançando em média 13 cm de largura, 11 cm de altura e 6 cm de espessura (COUTO; REIS; CASSALI, 2007; BERNARDES, 2011). Fisiologicamente se expandem em detrimento da gestação e lactação, e atrofiam-se depois de transcorrido o período de menopausa. Internamente a mama é composta por estruturas celulares que permitem a produção láctea a partir de sinalização hormonal e ductos que canalizam um líquido nutritivo para o meio externo (Figura 4) (GOSS, 1997; SOBOTTA, 2000; GUYTON; HALL, 2011).

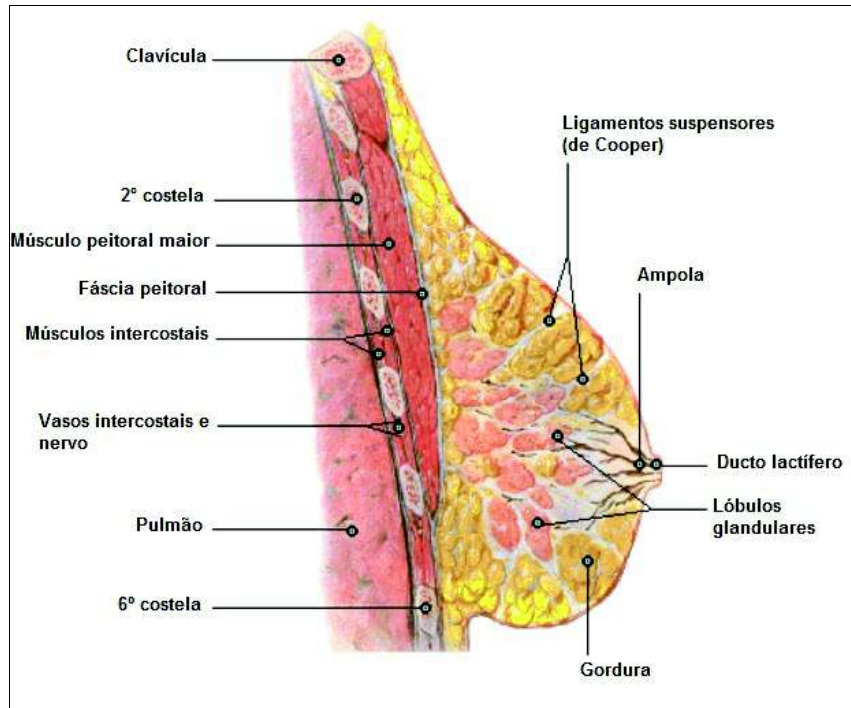


Figura 4. Estrutura anatômica da mama feminina.
Fonte: NETTER (2011).

O tecido mamário é recoberto por linfonodos, denominados ainda de gânglios ou nódulos linfáticos. Os linfonodos são estruturas conectadas por uma rede de ductos, capilares e vasos que compreendem o sistema linfático, principal sistema circulatório em conjunto ao sistema vascular, envolvido em atividades fisiológicas indispensáveis à homeostase (TANAKA; IWAKIRI, 2016). Assim como os vasos sanguíneos e artérias, o sistema linfático circula por todo o corpo atuando primordialmente no processo de resposta imunológica a patógenos e na drenagem de líquido intersticial (Figura 5) (SOBOTTA, 2000; BERNARDES, 2011).

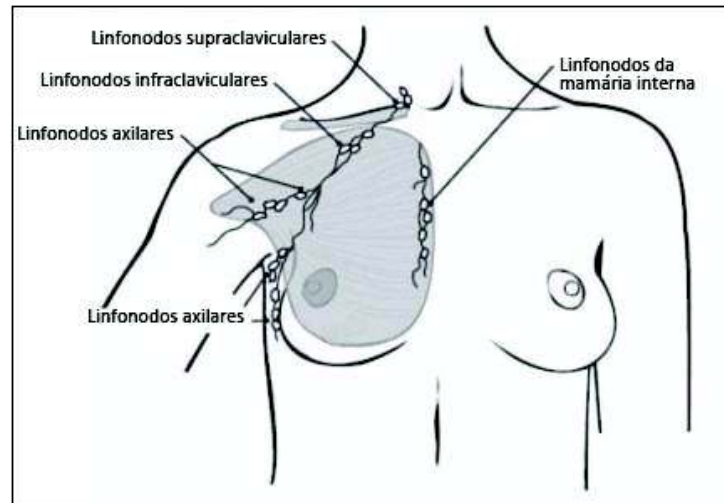


Figura 5. Linfonodos mamários.
Fonte: American Cancer Society (2011).

1.1.3. SUB-LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA

O tecido mamário é subdividido em localizações anatômicas passíveis de identificação de modo a auxiliar a reflexão teórica, os procedimentos clínicos e a conduta terapêutica adequada (Figura 6) (BAO et al. 2014). O sistema de divisão considera o mamilo como ponto central, sendo cortado ao meio por uma reta vertical e outra transversal (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND; 2004; 2012).

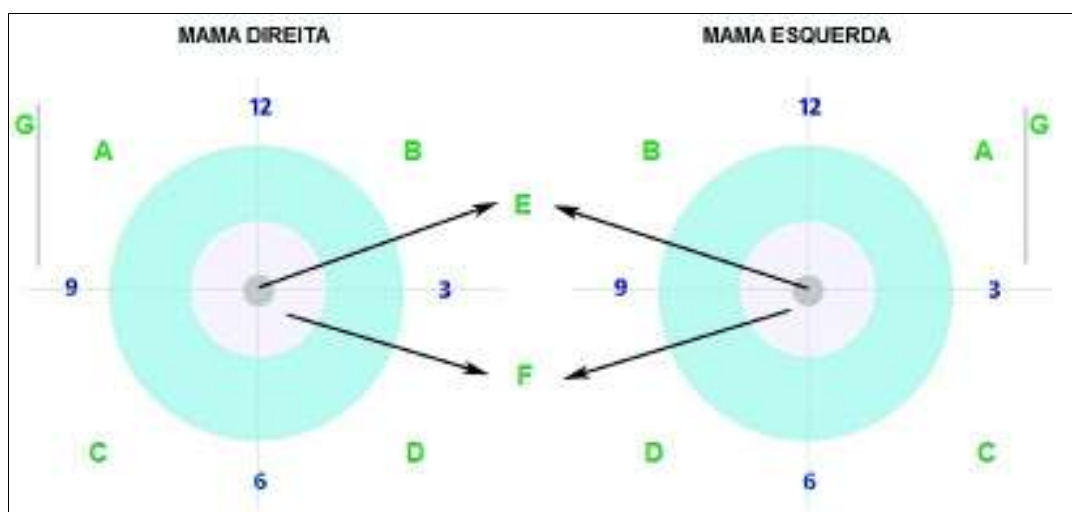


Figura 6. Sub-localização anatômica. A) Quadrante superior externo; B) Quadrante superior interno; C) Quadrante inferior externo; D) Quadrante inferior interno; E) Mamilo; F) Porção central; G) Prolongamento axilar.

Fonte: Adaptado de BAO et al., 2014.

1.1.4. EPIDEMIOLOGIA

O câncer de mama é uma neoplasia frequente e acomete mulheres em todo o mundo (MEDIMEGH et al., 2014). Estatísticas do projeto Globocan/IARC (*International Agency for Research on Cancer*) de 2012 destacam que o câncer de mama (1,7 milhão) representou o segundo tipo de câncer mais incidente em todo o mundo, atrás somente do câncer de pulmão (1,8 milhão), e elegível como o primeiro mais incidente e indutor de óbito na população feminina (Figura 7) (INCA, 2016; ALINEJADA et al., 2017; FORCADOS et al., 2017). No Brasil, foram registradas 14.388 mortes por câncer de mama no ano de 2013, sendo 181 homens e 14.206 mulheres (INCA, 2016).

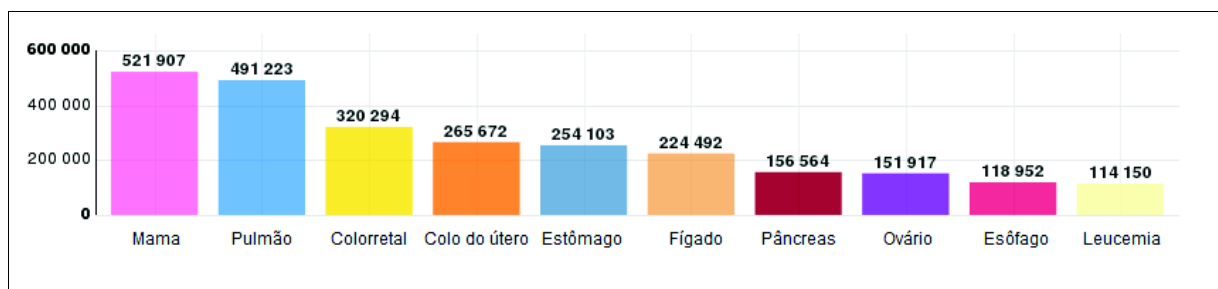



Figura 7. Número estimado de mortes em mulheres de todo o mundo (10 principais sítios de câncer), em 2012.

Fonte: GLOBOCAN, 2012.

As estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimam 57.960 novos casos de câncer de mama para o ano de 2016 no Brasil (Figura 8) (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.820	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.
Fonte: INCA, 2016.

Para o Estado de Goiás, as estatísticas predizem cerca de 1.680 novos casos de câncer de mama no ano de 2016. Destes, foram previstos 250 novos casos acometendo a população da metrópole goiana (INCA, 2016).

Dentre as localizações anatômicas alvo do carcinoma mamário na população mundial e brasileira, destaca-se o epitélio ductal, em torno de 80%, dos quais se encontram distribuídos em diferentes subtipos moleculares. Os outros 20% estão distribuídos como lobular, tubular, mucinoso, medular, micropapilar e papilar (INCA, 2016).

Enquanto as taxas de mortalidade por câncer de mama nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil tem aumentado, nas regiões Sul e Sudeste houve um declínio nos últimos anos. Provavelmente uma associação com as melhores condições socioeconômicas nestas regiões, culminando em melhores índices de acesso ao tratamento e de técnicas para o diagnóstico precoce. A sobrevida global de mulheres brasileiras acometidas pela doença tem melhorado progressivamente, sendo estimados 85% de sobrevida ao longo de cinco anos (FREITAS-JÚNIOR et al., 2017). Um estudo estimou a cobertura mamográfica em rastreamento oportunista realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, em 2013, e observou baixa cobertura mamográfica na região Norte 12,0%. Contrapondo este percentual, a prevalência de mamografias na região Sul foi de 31,3%. A conclusão dos autores sugere baixa cobertura mamográfica realizada pelo SUS no Brasil e alto índice de desigualdade quando estratificado por unidades da Federação (FREITAS-JÚNIOR et al., 2016).

O índice de desenvolvimento humano, índice de exclusão social, cobertura mamográfica e de acesso ao sistema de saúde, bem como as variações étnicas e geográficas, com destaque às mulheres de cor branca e amarela, de idade superior a 50 anos, representam fatores capazes de influenciar as taxas de mortalidade por câncer de mama. Melhorias na qualidade das informações a respeito do câncer de mama têm apontado para melhor sobrevivência por permitir a identificação precoce de tumores e conseqüentemente de tratamentos mais eficazes (GONZAGA et al., 2015; SOARES et al., 2015). Um estudo com objetivo de avaliar a prevalência do câncer de mama em Goiânia, Goiás, Brasil, no período de 1988 a 2002, constatou aumento da taxa de incidência da doença e sugeriu que este aumento esteja possivelmente relacionado à melhora do rastreamento e do tratamento do câncer de mama na região (MARTINS et al., 2011).

1.1.5. FATORES DE RISCO

O câncer de mama é uma doença com múltiplos fatores de risco, podendo ocorrer a partir de mutações adquiridas ao longo do tempo ou repassadas à prole por meio da hereditariedade (FORCADOS et al., 2017). Embora exista grande diversificação dos tumores que acometem a mama, todos os cânceres de mama apresentam origem genética.

A maior parte dos tumores de mama, 80 a 90%, é categorizada como somática, ocorrendo como consequência de mutações induzidas por agentes carcinogênicos, hábitos de vida, sedentarismo, menarca precoce, menopausa tardia, obesidade após a menopausa (ROSNER et al., 2017), uso de contraceptivos orais (estrogênio e progesterona), reposição hormonal pós-menopausa (LI et al., 2016), nuliparidade ou primeira gestação após os 30 anos de idade, hábito etilista, etnia, fatores ambientais e a relação destes com a exposição celular.

A exposição aos fatores ambientais e biológicos favorece a probabilidade do tecido mamário desenvolver algum tipo de câncer, e são denominadas como fatores de risco. Os fatores de risco são classificados em três grandes grupos: muito elevados, medianamente elevados e pouco elevados conforme importância do tipo de

exposição ou característica populacional que predisponha o indivíduo (Quadro 1). Os demais subtipos de cânceres de mama, aproximadamente 10 a 20%, são de origem hereditária, sendo herdados de pais para filhos e podem estar relacionados a mutações em genes de supressão tumoral, a proto-oncogenes ou outras condições que afetam a expressão dos genes (KRAJC et al., 2008).

Quadro 1. Fatores de Risco para o câncer de mama.

Risco muito elevado (RR ≥ 3.0)
Mãe ou irmã com câncer de mama na pré-menopausa Antecedente de hiperplasia epitelial atípica ou neoplasia lobular in situ Suscetibilidade genética comprovada (mutação de BRCA1-2)
Risco medianamente elevado (1.5 ≤ RR < 3.0)
Mãe ou irmã com câncer de mama na pós-menopausa Nuliparidade Antecedente de hiperplasia epitelial sem atipia ou macrocistos apócrinos
Risco pouco elevado (1.0 ≤ RR < 1.5)
Menarca precoce (≤ 12 anos) Menopausa tardia (≥ 55 anos) Primeira gestação de termo depois de 34 anos Obesidade Dieta gordurosa Sedentarismo Terapia de reposição hormonal por mais de 5 anos Ingestão alcoólica excessiva

Fonte: BARROS et al (2001).

No que diz respeito à ação hormonal na carcinogênese mamária destaca-se a ação dos estrógenos, prolactina, progesterona, andrógenos e hormônios tireoidianos. Quanto maior for o período de exposição do epitélio mamário a ação conjunta destes hormônios, mais se eleva o risco de desenvolvimento da doença (BRISKEN; O'MALLEY, 2010). A ação mitótica do estrógeno parece ser facilitada em virtude dos níveis de prolactina, o que resulta no aumento do número de receptores estrogênicos. A ação estrogênica estimula o crescimento celular por meio de incitação à liberação do fator de crescimento tumoral alfa e do fator de crescimento semelhante à insulina, e inibição do fator de crescimento tumoral β (YOO et al., 2001; ROCK; CHERYL, 2002; BRISKEN; O'MALLEY, 2010).

Ademais, a própria homeostase corporal apresenta condições que colaboram com a tumorigênese. A menarca em idade precoce expõe o corpo feminino a maior atividade hormonal em relação à menarca tardia. Neste sentido, mensalmente as células se preparam para diferenciar e realizar sua função primordial, a lactação, e na maioria das ocasiões regridem a um período estacionário a partir da ação de hormônios, próprios do ciclo menstrual. A não fertilização, ou não formação de zigoto, resulta na descamação do endométrio e inicia-se novo ciclo a partir da regulação hormonal (KAMIŃSKA et al., 2015).

Assim como a menarca precoce, a menopausa tardia também constitui elemento que ameaça o tecido mamário. As células da mama sofrem um processo denominado de involução com o advento da menopausa e esse evento confere às células menor susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (KAMIŃSKA et al., 2015). A menopausa é considerada quando sua ocorrência tardia, que resulta no prolongamento da atividade hormonal sobre as células mamárias, promovendo excitação e ativação da maquinaria intracelular de forma constante (LI et al., 2016).

O primeiro trimestre de gestação é marcado pelo aumento de estradiol e confere maior risco carcinogênico. Transcorridos os três primeiros meses, o risco é minimizado e a mama recebe fatores que a protegem da ação carcinogênica. Ocorre aumento de globulinas transportadoras de esteroides sexuais, resultando na diminuição dos níveis de estrógeno circulante. Na gestação incompleta não é observada essa proteção (LOURO, 2000; PECK et al., 2002; HILAKIVI-CLARKE et al., 2012)

O uso de métodos contraceptivos e a reposição hormonal são descritos por vários autores como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, principalmente quando associados à menarca precoce e à menopausa tardia, colaborando para maior exposição celular à ação dos estrógenos e progesterona (KAMIŃSKA et al., 2015; ALIM; KIZILTAN, 2016; GOLUBNITSCHAJA et al., 2016). A utilização de contraceptivos orais, de forma semelhante à ação do ciclo menstrual, estimula a atividade mitótica nas células mamárias. O uso de contraceptivos orais por mulheres com histórico familiar de câncer de mama oferece maior risco em relação às mulheres sem histórico familiar da doença (KAMIŃSKA et al., 2015).

A obesidade, outro fator de risco importante para o câncer de mama, está ligado diretamente aos altos níveis de produção de estrógenos em detrimento da metabolização do tecido adiposo, gerando androstenediona que é metabolizada em estrona e, por fim, em estrógeno (YOO et al., 2001; ROCK; CHERYL, 2002). Existe uma relação entre o Índice de Massa Corpórea (IMC) e níveis circulantes de estrona, estradiol e testosterona em mulheres pós-menopausa e parece haver uma associação entre receptores de estrógeno (RE) positivos e maior mortalidade por obesidade (ALIM; KIZILTAN, 2016; YUNG; LIGIBEL, 2016).

O sedentarismo tem sido elencado como fator de risco para o câncer de mama. Um estudo de coorte realizado nos Estados Unidos avaliou 74.171 mulheres na pós-menopausa, entre 50 e 79 anos, praticantes regulares de atividade física intensa e mulheres inativas (MCTIERNAN, 2003). O estudo demonstrou que mulheres em atividade regular intensa tiveram uma redução de 14% no risco de câncer de mama (MCTIERNAN, 2003). O comportamento sedentário caracteriza-se por estar sentado ou deitado de forma prolongada e com ausência de movimentação ao longo do corpo, como hábitos de assistir televisão (TV), jogos em computador e outras formas de entretenimento baseado em tela. Algumas atividades trabalhistas também influenciam no sedentarismo, tal como o trabalho de secretárias (ZHOU; ZHAO; PENG, 2015). O comportamento sedentário foi relatado em estudos como associado à obesidade e ganho de peso, síndromes metabólicas e doenças cardiovasculares. Recentemente, este comportamento foi estudado frente às doenças neoplásicas e uma pequena associação foi descrita em uma metanálise composta por 21 estudos (ZHOU; ZHAO; PENG, 2015).

Além dos fatores descritos, inúmeras mutações genéticas são relacionadas à predisposição ao câncer de mama, dentre elas, destacam-se as mutações nos genes *p53*, *BRCA1* e *BRCA2* (*Breast Cancer susceptibility 1 and 2*), responsáveis por conferir elevado risco, seguidos de outros genes, como *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*), *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), *PALB2* (*Partner and localizer of BRCA2*), *RAD51C* (*S. cerevisiae, homolog of C*), *CDH1* (*cadherin 1*) e genes determinantes da síndrome de Lynch que conferem risco de moderado a alto (MAVADDAT et al, 2010; RUDOLPH; CHANG-CLAUDE; SCHMIDT, 2016), além de mais de 90 outras variantes comuns de baixa penetrância (MICHAILIDOU, 2015).

1.1.6. ESTADIAMENTO

O sistema de Classificação de Tumores Malignos (TNM) é aplicado tanto a carcinomas de tecidos mamários masculinos quanto femininos. É realizado a partir de informações clínicas – cTNM (Anexo A) - e posteriormente complementado com características histopatológicas – pTNM (Anexo B) (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2012).

A avaliação TNM considera: T - a extensão do tumor primário; N – ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais; e M – ausência ou presença de metástase à distância. Após definido o TNM é possível categorizar os tumores em estádios clínicos e patológicos, responsáveis por orientar a equipe médica em relação ao tratamento e à avaliação prognóstica (Quadro 2) (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2012).

Quadro 2. Grupamento por estádios.

	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1*	N0	M0
Estádio IB	T0, T1*	N1mi	M0
Estádio IIA	T0, T1*	N1mi	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0, T1*, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND (2012).

1.2. CARCINOGENESE MAMÁRIA

A replicação do DNA consiste de um pré-requisito para que ocorram divisões celulares e, por conseguinte, a continuação das espécies. As constantes divisões conferem aos organismos celulares a capacidade de ocorrência de erros resultantes do processo de replicação (MERTZ; HARCY; ROBERTS, 2017). Tais erros podem

induzir a célula à carcinogênese - processo pelo qual células normais adquirem características cancerígenas. A carcinogênese consiste em um sistema múltiplo e lento resultante da exposição a diferentes agentes ambientais ou mesmo em virtude de características hereditárias.

A transformação das células normais em pré-malignas se dá pela contínua exposição a fatores de risco, resultando em acúmulo de mutações irreversíveis, e posteriormente na estimulação da proliferação celular descontrolada, refratariedade aos sinais celulares de inibição do crescimento, perda de funções biológicas, principalmente do mecanismo apoptótico e da ação corretiva de mutações, neoformação vascular e eventual capacidade de metastatização e invasão de tecidos adjacentes (Figura 9) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

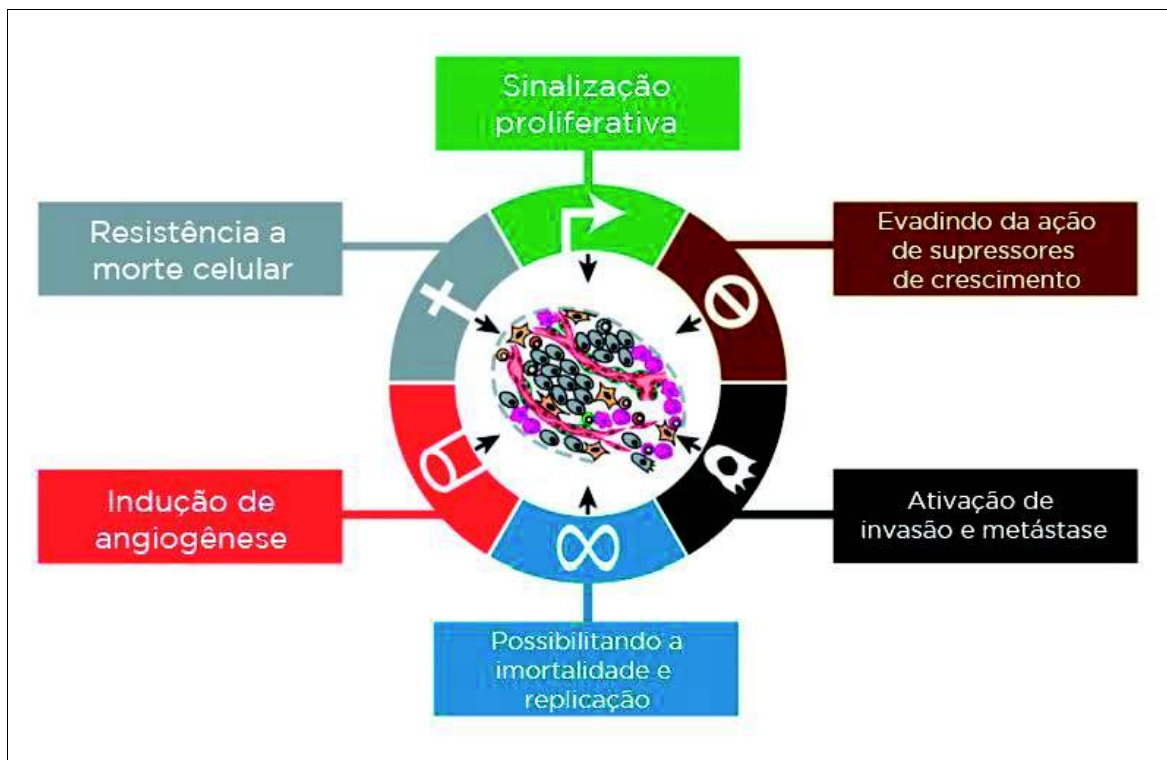


Figura 9. Características do câncer. Esta ilustração abrange as seis principais características do câncer originalmente propostas por Hanahan e Weinberg.

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG (2011).

O mecanismo de carcinogênese é didaticamente dividido em três estágios. (I) A iniciação é caracterizada pela exposição celular aos diversos fatores de risco com consequente indução de mutações, resultando na formação de células atípicas. (II) A promoção é o período em que a continuidade da exposição celular aos agentes

cancerígenos confere à célula propriedades malignas e multiplicação celular aumentada. A suspensão da exposição celular nesta etapa pode levar à parada do processo carcinogênico. (III) No terceiro estágio, a progressão, as células transformadas apresentam autonomia proliferativa, perdem a coesão e com isso adquirem capacidade migratória, tornando-se invasivas (MAREEL; LEROY, 2003).

A neoplasia ou a malignidade das células mamárias inicia-se primordialmente nos lóbulos ao final do período da puberdade, quando as células encontram-se indiferenciadas, com maior potencial de replicação e sendo alvos fáceis para lesões no DNA. A perda de mecanismos eficazes do reparo das mutações modifica o ciclo de vida celular, resultando em um clone alterado que repassa suas alterações às células-filhas (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). Essas alterações podem ocorrer em detrimento de exposição a agentes químicos, vírus e irradiações, resultante ainda de desordens hereditárias, distúrbios hormonais, dentre inúmeros fatores ambientais que induzem erros no processo de duplicação dos genes. As falhas neste processo levam ao surgimento do câncer de mama (LOURO, 2000; LOPES et al., 2016).

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea com relação à clínica e à morfologia (ROULO et al., 2016). As principais atividades que levam ao comportamento maligno da célula mamária caracterizam-se pela desregulação dos mecanismos apoptóticos, escassez de células mioepiteliais, alteração do epitélio em mesênquima, arquitetura tecidual desordenada e alterações da expressão gênica decorrentes das mutações (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). As principais mutações estão relacionadas aos genes supressores de tumor e aos proto-oncogenes. No grupo dos supressores tumorais destacam-se: *p53*, presente no braço curto do cromossomo 17, *BRCA-1* e *BRCA-2*, localizados no braço longo do cromossomo 17 e cromossomo 13, respectivamente, o gene *ATM* (*serine/threonine kinase*) no cromossomo 11 e *CHEK-2*, cromossomo 22. O gene *p53* produz uma proteína capaz de se ligar ao DNA e impedir a replicação deste, permitindo a restauração do genoma celular. Além disso, *p53* está diretamente ligado ao controle da proliferação e dos mecanismos de apoptose. Em torno de 50% dos cânceres de mama possuem mutações de *p53*. As mutações de *BRCA-1* e *BRCA-2* possuem características hereditárias, predispondo o indivíduo ao câncer de mama, ovário, próstata, cólon, pâncreas e laringe (DENG; BRODIE, 2001; INGVARSSON, 2001).

No grupo dos proto-oncogenes, destacam-se as ampliações do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2/ neu/ c-erb-2), *c-myc*, *int-2* e *ras*, levando ao aumento das proteínas codificadas por estes genes, o que favorece a multiplicação celular descontrolada (MAREEL; LEROY, 2003). O gene *HER-2*, importante marcador em câncer de mama, localiza-se no cromossomo 17q12, é responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembranar com domínio citoplasmático de tirosina quinase, onde se liga um fator de crescimento epidermal no domínio extracelular (NCBI, 2017).

1.2.1. SUBTIPOS MOLECULARES

Os diferentes perfis do carcinoma mamário permitiram estabelecer subgrupos a partir de características apresentadas por receptores celulares. Os resultados de técnicas imuno-histoquímicas visam à detecção de Receptor de Estrogênio (RE), Receptor de Progesterona (RP) e Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2), gerando resultados que posteriormente são utilizados para o devido enquadramento em seu respectivo subtipo. Quatro subtipos são bem conhecidos na literatura (Luminal A, Luminal B, HER2+ e Basal, este último denominado ainda triplo-negativo) e outros dois encontram-se em discussão (Claudina baixa e normal-like) conforme demonstrado na Figura 10 (PEROU et al., 2000; VIJVER et al., 2002; HU et al., 2006; MALHOTRA et al., 2010; MEDIMEGH et al., 2014).

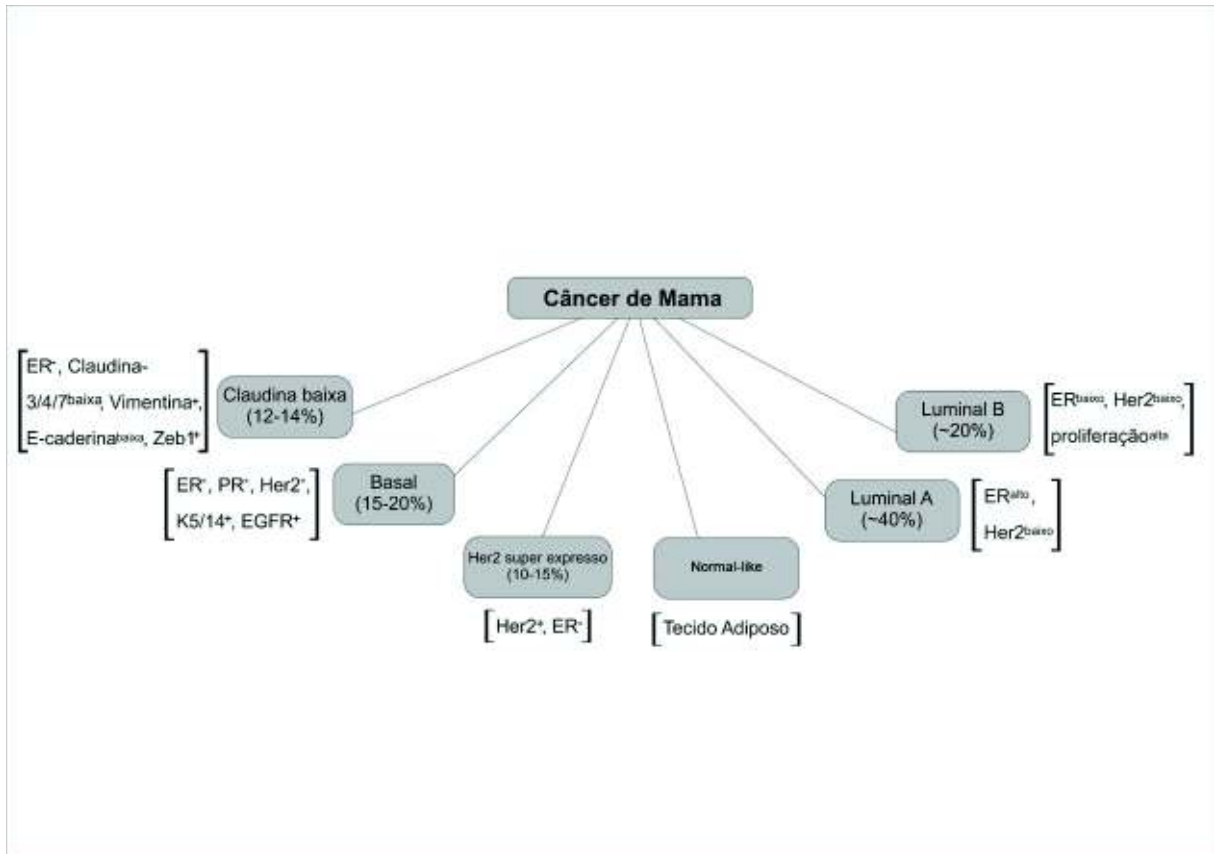


Figura 10. Classificação molecular do câncer de mama. Apresentação dos quatro subtipos mais conhecidos (Luminal A e B, HER+ e Basal) com acréscimo dos dois mais novos e de intensa discussão (Claudina baixo e normal-like).

Fonte: Adaptado de MALHOTRA et al. (2010).

O câncer de mama com fenótipo triplo-negativo (TN) representa em média 20% do total de cânceres de mama (BOYLE, 2012). Acomete frequentemente mulheres em idade jovem, apresenta perfil tumoral agressivo e relativa falta de alvos terapêuticos. Frequentemente, pacientes com câncer de mama TN apresentam mutações de BRCA1, contribuindo para o seu comportamento mais agressivo. Por outro lado, estudos sugerem semelhante característica em tumores não triplo-negativos que provavelmente se justifiquem em virtude de alterações epigenéticas e de reguladores pós-transcricionais. Aparentemente a expressão de microRNAs específicos influenciam os níveis homeostáticos da proteína BRCA1 (BOUKERROUCHA et al., 2015; MATAMALA et al., 2016; ZAVALA et al., 2016; M'HAMED et al., 2017) e outros genes potencialmente associados à carcinogênese mamária.

1.2.2. FATORES PROGNÓSTICOS

Fator prognóstico pode ser definido como parâmetro passível de mensuração no momento do diagnóstico, atuando como preditor do curso de desenvolvimento da doença, fornecendo informações relacionadas à sobrevida ou ao tempo livre de doença (ABREU; KOIFMAN, 2002). Sua avaliação é realizada a partir de informações do paciente e das características tumorais, como: estadiamento, proveniente do TNM clínico e patológico, grau de diferenciação, status menstrual, faixa etária, histórico familiar, informações provenientes de análises imunohistoquímicas dos receptores hormonais (RE e RP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (JR et al., 2012). Além disso, os fatores prognósticos podem auxiliar na escolha médica quanto aos casos elegíveis ao tratamento adjuvante. Algumas características são classificadas como fatores clássicos, sendo elas o estadiamento, tipo e grau histológico, expressão de receptores hormonais e de HER2. O Colégio Americano de Patologistas estabeleceu em reunião de consenso os fatores prognósticos em câncer de mama (Tabela 1) (FITZGIBBONS et al., 2000).

Tabela 1. Fatores prognósticos em câncer de mama (FITZGIBBONS et al., 2000).

Fatores prognósticos em câncer de mama - Consenso do Colégio Americano de Patologistas	
Categoria 1	Estadiamento TNM
	Tipo histológico
	Grau histológico
	Contagem de mitose
	Estado de receptores hormonais
	HER-2
	MIB-1
Categoria 2	Invasão vascular/linfática
	p53
	DNA fração S
	Ploidia de DNA
	Angiogênese tumoral
Categoria 3	Receptor para fator de crescimento epidérmico
	Fator de crescimento transformador α
	BCL-2
	pS2
	Catepsina D

O tamanho do tumor é um dos parâmetros avaliados no estadiamento clínico, e é um dos maiores preditores do comportamento tumoral. Quanto maior o diâmetro tumoral, maiores são as possibilidades do comprometimento linfonodal e de metastatização (FITZGIBBONS et al., 2000). A frequência de metástases em pacientes com tumores medindo 1 cm ou menos varia entre 10% e 20%, aumentando-se o risco consonantemente quando verificados maiores diâmetros. O segundo parâmetro do estadiamento clínico é a análise do acometimento linfonodal, que influencia o prognóstico de pacientes com câncer de mama (FITZGIBBONS et al., 2000). Cerca de 20% a 30% de mulheres com nódulos negativos desenvolvem recidiva. O número de linfonodos acometidos também é de suma importância prognóstica, sendo que mulheres com acometimento de 4 ou mais linfonodos apresentarão pior prognóstico (FITZGIBBONS et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), da União Europeia (EU), e do *Royal College of Pathologists* (RCPATH UK) recomendam a avaliação da graduação histológica pelo Sistema de Classificação de Nottingham (SCN) Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis, que classifica os tumores de mama em três diferentes graus. O grau histológico 1 apresenta melhor sobrevida para as pacientes no período de cinco anos, enquanto que o grau 3, maior grau, resulta em pior prognóstico (BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011). As variações histológicas resultam em distintos comportamentos biológicos do tecido tumoral, e podem conferir diferentes níveis de agressividade, favorecendo ou inibindo o processo metastático. O carcinoma ductal infiltrante, comumente seguido de acometimento linfonodal, apresenta pior prognóstico em relação aos cânceres de mama menos frequentes (FITZGIBBONS et al., 2000).

Biomarcadores clássicos compõem a avaliação prognóstica, sendo eles os Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e Receptores do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2). Os RE são elencados como mais importantes biomarcadores, pois a presença destes torna a paciente elegível à terapia endócrina a partir do uso de esteroides hormonais. Os níveis de expressão de RE podem influenciar no tratamento, havendo melhor resposta quando estes se encontram mais expressos (BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011). A maior parcela de pacientes com câncer de mama RP positivo apresenta RE positivo, e por isso tais pacientes são candidatas à terapia endócrina. Cerca de 1% dos casos RP positivos

apresentam RE negativo, e neste caso recomenda-se a terapia endócrina em detrimento de poucos benefícios com o uso de tamoxifeno (VIALE et al., 2007).

A amplificação de HER2 ocorre em 15% a 25% dos casos de câncer de mama e aumenta a agressividade tumoral, tornando estes casos resistentes à terapia endócrina. Terapias alvo dirigidas têm sido aplicadas aos casos HER2 positivos a partir do uso de trastuzumab e lapatinib (PICCART-GEBHART et al., 2005). Outros biomarcadores importantes são apresentados como emergentes nos casos de câncer de mama, como o Ki67, MIB-1, Ciclina D1, Ciclina E, ER β , e BCL-2 (FITZGIBBONS et al., 2000; BUITRAGO; UEMURA; SENA, 2011).

Estudos moleculares no câncer de mama têm revelado novos e importantes marcadores biológicos, identificados como possíveis preditores metastáticos, como o microRNA-10b (MA et al., 2007; PIAO; MA, 2012), alterações na expressão de *HER2* correlacionadas ao microRNA-7 (HUYNH; JONES, 2014), índices de marcação de Ki67 e *p53* (OHARA et al., 2016), hipermetilação de regiões do DNA codificadoras de supressores de tumor, seguidas ou não de amplificação de proto-oncogenes (ORDWAT et al., 2007), dentre inúmeros outros cofatores.

1.2.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O autoexame das mamas e as campanhas sociais, especialmente em países desenvolvidos, têm influenciado a demanda dos mastologistas (PENAULT-LLORCA; VIALE, 2012). A avaliação clínica inicia-se com exames de palpação, conduzidos por especialistas, que objetivam analisar a presença ou ausência de nódulos. A mamografia e/ou ultrassonografia é indicada a todas as mulheres após 40 anos de idade e realizadas anualmente em detrimento de tumores específicos não palpáveis. Os casos irregulares são confirmados por biópsia (PENAULT-LLORCA; VIALE, 2012).

O exame histopatológico é realizado a partir do produto de biópsia e/ou peça cirúrgica, e fornece informações ao clínico sobre as características neoplásicas. Os resultados histo-patológicos incluem: tamanho do tumor, tipo e grau histológico, invasão vascular peritumoral nos vasos sanguíneos ou linfáticos e estado linfonodal (FITZGIBBONS et al., 2000). Acrescenta-se ainda a avaliação das margens

cirúrgicas e de marcadores por imuno-histoquímica para análise dos receptores celulares, principalmente RP, RE e HER2. Estes marcadores podem fornecer informações importantes que auxiliam na categorização quanto ao subtipo molecular e colaborar com a escolha da conduta terapêutica (PENAULT-LLORCA; VIALE, 2012; INCA, 2016).

Para o oncologista clínico, as mulheres com câncer de mama são classificadas em três grupos principais, e direcionadas a terapias fundamentadas pelo estadiamento, sendo: (I) receptores hormonais positivos, submetidas a terapias para reposição de estrogênio, havendo ou não quimioterapia; (II) tumores HER2+, receberão terapia específica para HER2, baseadas em anticorpos monoclonais; e (III) pacientes que apresentam RE, RP e HER2 negativos, para as quais a quimioterapia é a modalidade de escolha por ser a única forma de tratamento sistêmico. No grupo I enquadram-se os carcinomas com perfil Luminal A e Luminal B, no grupo II somente fenótipos HER2+ com RP e RE negativos, e o grupo III destinado aos fenótipos que apresentam todos os receptores negativos pela técnica imuno-histoquímica (REIS-FILHO; TUTT, 2008).

Procedimentos neoadjuvantes, concomitantes às aplicações acima supracitadas, podem ser eleitos pela equipe médica, de modo a tornar o tumor ressecável, desta forma, minimizando consideravelmente a possibilidade de processos cirúrgicos radicais, como a mastectomia. A adjuvância é empregada e relativa às características tumorais e resposta aos tratamentos clínicos (BARROS et al., 2001).

1.2.4. BRCA1

Alterações genéticas relacionadas aos carcinomas de mama e de ovário têm sido descritas por inúmeros autores e, dentre elas, destacam-se as mutações do gene *BRCA1*, responsável por conferir alta suscetibilidade à carcinogênese (HARADA et al., 2013; MANIE et al., 2015; LIU et al., 2016; SHI et al., 2017). Portadores de mutação germinativa em *BRCA-1* apresentam risco de desenvolvimento de câncer de mama variando entre 44 a 68% até os 70 anos de

idade (FELICIO et al., 2016). Este gene está localizado no cromossomo 17q21, sendo responsável pela expressão da fosfoproteína BRCA1, que é composta por uma sequência de 1.863 aminoácidos. Atua conjuntamente a outras proteínas sensíveis a danos estruturais no DNA, promovendo reparo imediato (LI; GREENBERG, 2012; NCBI, 2016).

Inúmeras funções têm sido atribuídas a BRCA1, havendo interações entre os domínios funcionais desta molécula com pelo menos 13 diferentes proteínas (Figura 11), sugerindo que BRCA1 faz parte de uma rede de sinalização com papel fundamental no processo de manutenção genômica (LI; GREENBERG, 2012). Nos 150 primeiros aminoácidos de BRCA1 verifica-se um domínio RING que heterodimeriza com o domínio RING N-terminal de BARD1, levando a atividade de E3 ubiquitina ligase. Adjacente ao RING de BRCA1 há um sequência de localização nuclear. Em situações de lesão na cadeia de DNA, a ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a *checkpoint kinase 2* (Chk2) são ativadas e fosforilam diversos mediadores, dentre eles BRCA1. A fosforilação de BRCA1 ocorre em sua porção central, exon 11, região que contém resíduos de substrato de fosforilação para ATM e Chk2. A ativação de BRCA1 induz essa molécula a interagir com pelo menos quatro diferentes complexos de proteínas, que resultam em reparos de lesões no DNA por meio recombinação homologa de cadeia dupla. É importante observar ainda que BRCA1 atua nas forquilhas de replicação, reparando lesões importantes (LI; GREENBERG, 2012).

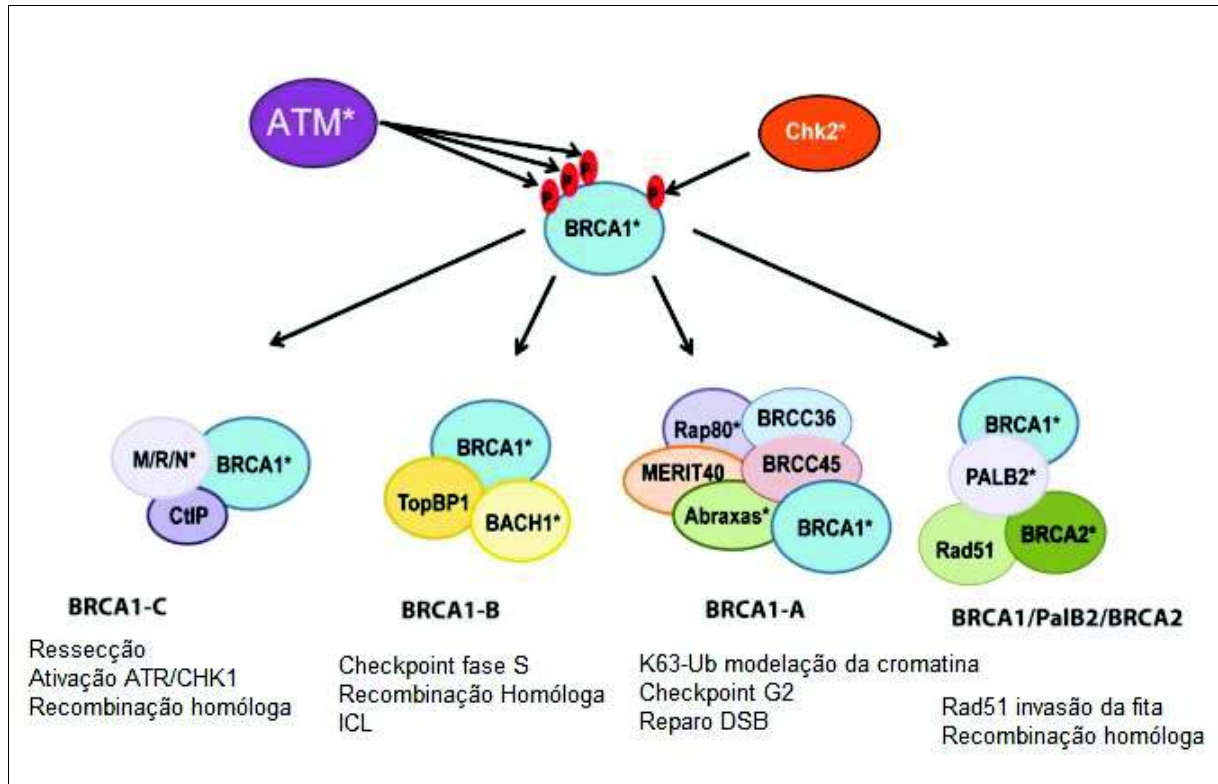


Figura 11. Ativação de BRCA1. O desenho esquematiza a ativação de BRCA1 por meio da fosforilação promovida por ATM e Chk2. Após fosforilação, BRCA1 liga-se a outras proteínas, formando um complexo de proteínas, que atuará sobre a molécula de DNA lesionada, promovendo reparo. Em asterisco, proteínas frequentemente mutadas em câncer de mama e câncer de ovário. **Fonte:** Adaptado de LI; GREENBERG (2012).

A atividade de *BRCA1* está relacionada à manutenção genômica por meio de inúmeros mecanismos, tais como: reconhecimento de lesões no DNA, transcrição, regulação do ciclo celular e reparo de lesões na molécula de DNA (FELICIO, et al., 2016; DENSHAM; MORRIS, 2017). Dentre as funções desempenhadas por este gene, é de suma importância a atuação exercida no reconhecimento de sequências homologas, garantindo estabilidade genômica e suprimindo a tumorigênese (ISONO et al., 2017).

Cerca de 40% dos carcinomas de mama de origem hereditária possuem mutações em *BRCA1*, sendo estas encontradas ainda em mais de 80% dos casos de cânceres de mama concomitantes ao câncer de ovário (NCBI, 2016). Até a presente data, 2054 mutações pontuais já foram identificadas em *BRCA1* (HGMD, 2017).

Além de mutações pontuais que levam à deficiência da proteína BRCA1, novos estudos têm demonstrado o papel da metilação em ilhas CpG, localizadas na

região promotora de *BRCA1*, impedindo que fatores de transcrição reconheçam essa região, resultando no silenciamento gênico (WU et al., 2013; GUO et al., 2015; WU, 2016), e também pela ação de microRNAs, que desempenham importante papel na regulação pós-transcricional de genes supressores de tumor e em oncogenes, incluindo-se o mRNA de *BRCA1* (RAYCHAUDHURI et al., 2017).

1.2.5. MICRORNAS

1.2.5.1. RNAs não codificantes

A partir da década de 1980, o campo da biologia molecular cresceu de forma exponencial, seja em relação ao desenvolvimento de técnicas ou aos resultados de extensivas análises genômicas que seguidamente originam as pesquisas transcriptômicas, metabolômicas e proteômicas. O transcriptoma é conjunto de produtos transcritos, proveniente da ação da RNA polimerase sobre o DNA, e compreende parte deste avanço científico, denominado transcriptômica – estudo dos transcritos (MEISTER, 2011). Recentemente, RNAs não codificadores de proteínas emergiram na literatura e novas funções foram descritas para essas moléculas. Um marco na história dos RNAs está relacionado à descoberta de seu amplo envolvimento no processo de regulação gênica (SHARP, 2009).

Os pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) foram descobertos em plantas e tornaram-se importantes objetos de pesquisa em diversos organismos (MEISTER, 2011). Esses ncRNAs incluem os RNAs ribossômicos (rRNA), RNAs de transferência (tRNA), microRNAs (miRNA), pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) e pequenos RNAs nucleares (snRNAs) com papel crítico na regulação de processos biológicos fundamentais à homeostasia corporal, e ainda das condições fisiopatológicas (AMORIM et al., 2016). O estudo dos ncRNAs expandiu-se rapidamente, a fim de elucidar sua relação com a expressão gênica, as condições que resultam em doenças humanas, assim como para a idealização de ferramentas eficazes ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas (YUN; PAN, 2012).

No ano de 1993, Lee, Feinbaum e Ambros descobriram que *Lin-4*, um gene essencial na regulação do desenvolvimento do nematóide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), não codificava para uma proteína e, ao invés disso, produzia pequenos RNAs, com cerca de 22 e 61 nucleotídeos que correspondiam à sequência complementar de um elemento da sequência repetida na região 3' não traduzida (UTR) do transcrito de *Lin-14*, inibindo sua expressão (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; HUANG et al., 2010).

Em 1998, Andrew Fire e Craig Melo, em seus experimentos com o verme *C. elegans*, descobriram uma molécula de RNA interferindo no processo de expressão gênica e deram a este processo o nome de RNA de interferência (iRNA) (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; MEISTER, 2011). Após o achado, inúmeros estudos emergiram

1.2.5.2. Biossíntese de microRNAs

Genes responsáveis pela codificação de miRNAs podem estar localizados em regiões intrônicas ou exônicas de genes codificadores de proteínas ou ainda em regiões intergênicas (Figura 12). O produto gerado, uma pequena molécula de RNA fita simples, possui em média 21 nucleotídeos. Por meio de pareamento de bases com moléculas de RNAs mensageiros dispersos no citoplasma celular induzem ao silenciamento ou à degradação do RNA mensageiro (HUANG et al., 2010).

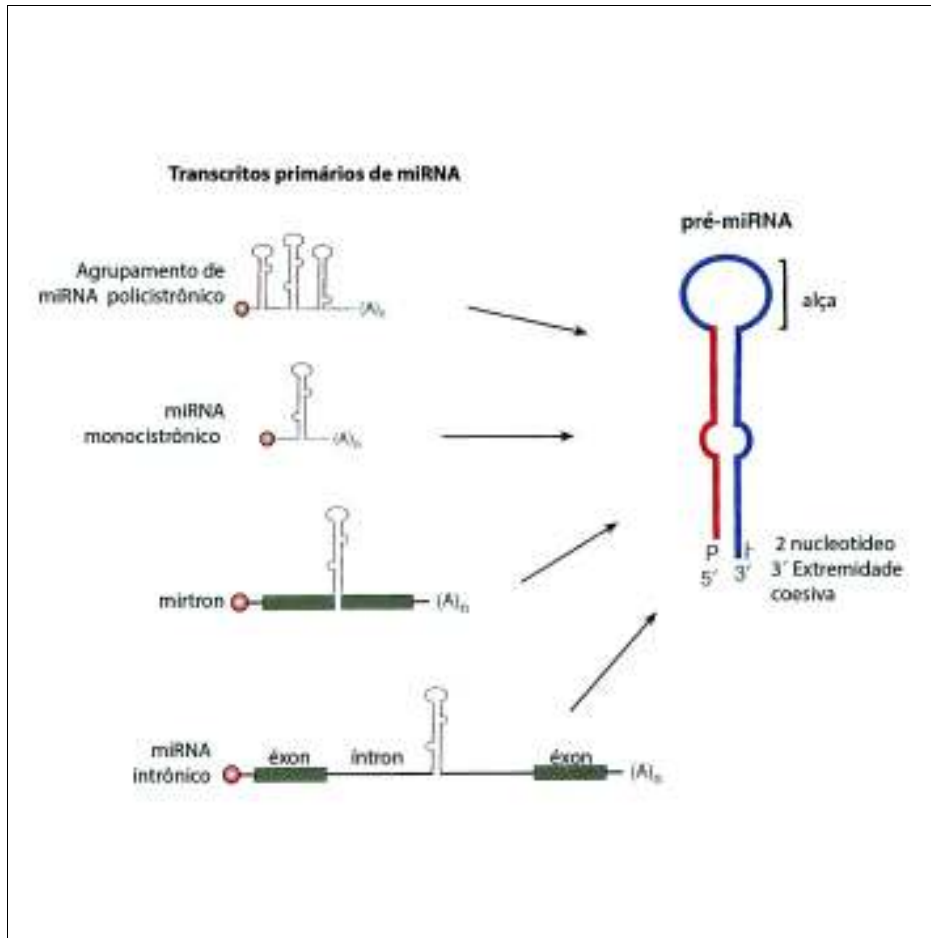


Figura 12. Organização genômica de genes de microRNAs.
Fonte: Adaptado de MEISTER (2011).

Os microRNAs são transcritos no interior do núcleo celular a partir da atividade da enzima RNA polimerase II. O primeiro produto gerado recebe o nome de microRNA primário (pri-miRNA), uma molécula de RNA contendo extremidade cap 5' com uma 7-metil guanosina e cauda poli-A (Figura 13) (VIMALRAJ; SELVAMURUGAN, 2013). Em alguns casos a RNA polimerase III realiza a síntese de miRNAs. Ainda no interior do núcleo, um microprocessador composto pela Drosha III e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene 8*) processa o pri-miRNA, removendo-lhe uma região da haste dupla fita e das sequências flanqueadoras, originando os denominados pré-miRNAs (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; KIMA; KIMA; KIM, 2016). Os pré-miRNAs são sequências compostas por 70 a 100 nucleotídeos e assim como os pri-miRNAs possuem forma de grampo. Os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma celular a partir de sua interação com o receptor de exportação RanGTP exportina-5 (YI, 2003; HATA; KASHIMA, 2015).

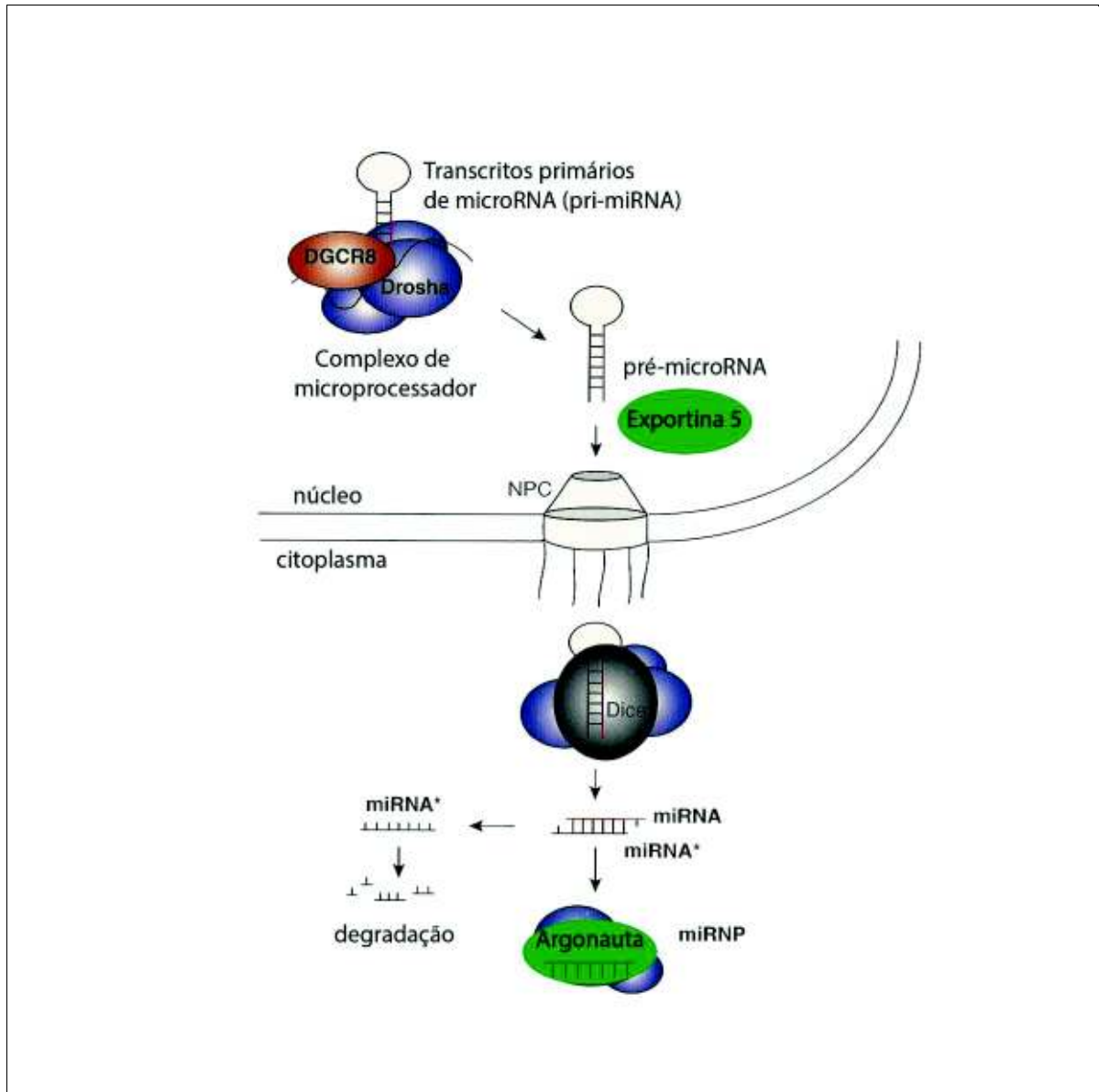


Figura 13. Biossíntese de microRNA.
Fonte: Adaptado de MEISTER (2011).

No citoplasma, a RNase III Dicer em conjunto com a proteína TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) cliva a alça e gera uma pequena molécula dupla fita de aproximadamente 21 nucleotídeos (HATA; KASHIMA, 2015). Em seguida, uma fita do microRNA dúplex é degradada e a outra fita incorporada a um complexo de proteína denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), tornando-se um microRNA maduro (MEISTER, 2011).

1.2.5.3. MicroRNAs e suas funções

O grau de complementaridade entre o microRNA e o RNA alvo é responsável por influenciar como ocorrerá a atuação do miRNA sobre a molécula de RNA. Três mecanismos distintos resultam na regulação da expressão gênica, sendo considerados a atuação dos microRNAs como siRNAs, inibição da tradução e indução de deadenilação (SUN; TSAO, 2008). No primeiro caso, a complementaridade perfeita ou quase perfeita entre o microRNA e o mRNA alvo resulta na clivagem da molécula de RNAm. Essa clivagem ocorre em virtude da ação de uma endonuclease, a Ago2, uma proteína pertencente ao grupo das Argonautas. A inibição da tradução relaciona-se com a posição do microRNA em seu RNAm alvo, responsável pela interação com a maquinaria de tradução. A deadenilação pode ser induzida quando ocorre complementaridade parcial do microRNA e sua molécula alvo, havendo interações importantes com proteínas membro da família GW (MEISTER, 2011).

1.2.5.4. MicroRNAs e câncer

A atividade dos microRNAs na progressão tumoral é amplamente complexa. Inúmeras alterações celulares ocorrem para transformação da célula pré-maligna e obtenção do estado maligno (SUN; TSAO, 2008). As técnicas de microarranjo, PCR em tempo real e chips têm demonstrado diferentes níveis de expressão de microRNAs relacionados aos mais distintos tipos de câncer (LU et al., 2014). A hiperexpressão de microRNAs, referidos como OncomiRs, resulta no silenciamento de genes supressores de tumor, enquanto a hipoexpressão de outros microRNAs têm sido relacionada à inibição da progressão tumoral, sendo estes denominados miRNAs de supressão tumoral. Estes últimos miRNAs reprimem a tradução de moléculas de RNAm que atuam favorecendo a oncogênese (JI; SUN; SU, 2017).

1.2.5.5. MicroRNAs e câncer de mama

De igual maneira, a atuação de microRNAs no tecido mamário pode favorecer a carcinogênese ou atuar como fator protetor (MEISTER, 2011). Muitos microRNAs são focos de estudos que investigam possíveis associações com as variáveis clinicopatológicas. A formação de um tumor poder iniciar a partir da perda ou deleção de miRNAs de supressão tumoral, pela amplificação ou superexpressão de OncomiRs, havendo ainda possibilidade de participação de metastamiRs com efeitos pró ou anti-metastáticos (O'DAY; LAL, 2010). A Tabela 2 sistematiza os principais microRNAs descritos na literatura em carcinomas de mama, informando seus principais alvos e respectivas funções.

Tabela 2. MicroRNAs e seus alvos em câncer de mama. Adaptado de O'DAY; LAL (2010).

miRNA	Alvo	Função
miRNAs supressor de tumor		
miR-206	ESR1	Sinalização RE
miR-17-5p	AIB1, CCND1, E2F1	Proliferação
miR-125a, b	HER2, HER3	Crescimento dependente de ancoragem
miR-200	BMI1, ZEB1, ZEB2	Sinalização TGF- β
let-7	H-RAS, HMGA2, LIN28, PEBP1	Proliferação, diferenciação
miR-34a	CCND1, CDK6, E2F3, MYC	Dano ao DNA, proliferação
miR-31	FZD3, ITGA5, M-RIP, MMP16, RDX, RHOA	Metástase
OncomiRs		
miR-21	BCL-2, TPM1, PDCD4, PTEN, MASPIN	Apoptose
miR-155	RHOA	Sinalização TGF- β
miR-10b	HOXD10	Metástase
miR-373/520c	CD44	Metástase

O hsa-miR-10b é um tipo de microRNA e suas alterações têm sido descritas em vários tipos de neoplasias (LU et al., 2014; KHELLA et al., 2017; M'HAMED et al., 2017). A hiperexpressão deste microRNA foi observada em câncer esofágico, câncer de cavidade oral, câncer de pulmão, schwannoma vestibular, adenoma pituitário, câncer de próstata e glioma (SASAYAMA et al., 2009; LU et al., 2012; TEPLYUK et al., 2012; LIANG et al., 2013; TORRES-MARTIN et al., 2013; WALTER et al., 2013; XIE et al., 2013). A hipoexpressão já foi observada em câncer de células renais, câncer renal, câncer de cólon, carcinoma endometrial e melanoma (L HENEGHAN et al., 2010; WU et al., 2012;). Por outro lado, uma metanálise demonstrou que os níveis de expressão de miR-10b foram inconsistentes em outros tumores, como é o caso do câncer de mama e carcinoma hepatocelular (LU et al., 2014). Essa inconsistência se deve ao reduzido número de estudos que até a data de sua publicação avaliaram a expressão de miR-10b nestes espécimes tumorais (MORIARTY; PURSELL; MERCURIO, 2010; LU et al., 2014). Contudo, estudos recentes têm demonstrado associação entre a expressão de miR-10b e desenvolvimento de metástase linfonodal (MA et al., 2007; WANG et al., 2016; M'HAMED et al., 2017).

O miR-10b é expresso na maioria dos tecidos humanos com exceção do cérebro, em condições normais. Sua função principal compreende a inibição do ciclo celular e a interrupção da morte celular programada (MA; TERUYA-FELDSTEIN; WEINBERG, 2007; GABRIELY; TEPLYUK; KRICHEVSKY, 2011).

O hsa-miR-7, por outro lado, é um miRNA intrônico residente no primeiro intron do gene heterogêneo da proteína K ribonuclear (hnRNP K), e localiza-se no cromossomo 9 (Tabela 3). É conservado em todas as espécies, e aparentemente atua como supressor de tumor em células do tecido mamário (OKUDA et al., 2013). Em células fotorreceptoras de *Drosophila*, miR-7 demonstrou controlar a sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e promover a diferenciação dos fotorreceptores (REDDY et al., 2008). Em glioblastoma, miR-7 foi pouco expresso em comparação à expressão em tecido cerebral normal, demonstrando potencial ação de supressão tumoral por meio da inibição da expressão de EGFR, além de inibir a via Akt (KEFAS et al., 2008). Outro estudo confirmou que miR-7 regula EGFR em diversos cânceres humanos (WEBSTER et al., 2009). Um estudo verificou o papel de miR-7 na regulação de EGFR, sugerindo que miR-7 regula esse

gene em múltiplos níveis, e indicando este microRNA na terapêutica de carcinomas nos quais esta via de sinalização está ativada (LEEB; CHOIB; KIM, 2011).

Tabela 3. Localização e sequência gênica de hsa-miR-10b e hsa-miR-7.

Localização	microRNA	Sequência
2q31.1	10b	CCAGAGGTTGTAACGTTGTCTATATATACCCTGTA GAACCGAATTTGTGTGGTATCCGTATAGTCACAGA TTCGATTCTAGGGGAATATATGGTCGATGCAAAAA CTTCA
9q21.32	7	TTGGATGTTGGCCTAGTTCTGTGTGGAAGACTAG TGATTTTGTGTTTTTAGATAACTAAATCGACAACA AATCACAGTCTGCCATATGGCACAGGCCATGCCT CTACAG

Diversos estudos verificaram a atuação de diferentes microRNAs em carcinomas de mama. Alguns dos estudos que avaliaram a expressão de miR-7 e miR-10b em casos de câncer de mama estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Alguns estudos que avaliaram a expressão de miR-10b e miR-7 em câncer de mama.

Referência	Tipo de Estudo	MicroRNAs avaliados	Metodologia	Resultados
M'HAMED et al., 2017.	Caso controle	miR-10b miR-26a miR-146a miR-153	Determinação de BRCA1 por imunohistoquímica.	Ausência de BRCA1 em 62,5% dos casos. Maior expressão de os miR-146a e miR-26a em câncer de mama triplo negativo.
WANG et al., 2016.	Metanálise	miR-10b	Avaliação de microRNAs por q-RT-PCR.	miR-10b e miR-153 significativamente associados à ocorrência de metástases linfonodais no câncer de mama triplo negativo. miR-10b, miR-26a, miR-146a e miR-153 não foram associados à expressão de BRCA1. A expressão elevada de miR-10b em pacientes com câncer de mama foi significativamente associada à sobrevida livre de doença (RR = 1,53; IC 95% = 1,06-2,21; P = 0,02). Os resultados demonstraram que a alta expressão de miR-10b pode predir a baixa sobrevida em pacientes com câncer de mama, todavia esta observação não foi conclusiva.
KALNIETE et al., 2015.	Caso controle	miR-10b miR-21 miR-29a miR-31 miR-214	q-RT-PCR.	O estudo correlacionou a alta expressão de miR-10b nos pacientes HER2+, e não mostrou influência quanto aos status de RE e RP. A expressão de miR-10b foi associada à sobrevida livre de doença, recidiva e o desenvolvimento metástase.
RADOJICIC et al., 2010.		miR-10b, miR-21, miR-122a, miR-145, miR-205, miR-210, miR-221, miR-222 e miR-296	q-RT-PCR.	Foram investigados nove microRNAs em 49 casos primários de câncer de mama triplo-negativos (TN) e 34 amostras normais. O miR-10b foi hipoexpresso nos casos TN. Foi observado ainda que miR-10b é responsável pela pelo processo metastático, ativando RHOC, por meio do silenciamento da síntese do fator de transcrição D10 (HOXD10). O miR-10b esteve fortemente expresso em células metastáticas.

MA et al., 2007.	Cultura celular, Pré-clínico	miR-10b	q-RT-PCR imuno- histoquímica.	Utilizando combinação de células humanas e ratos, foi demonstrado que miR-10b é altamente expresso em células de mama metastática, regulando positivamente a migração e invasão celular. Por meio de técnicas computacionais, o estudo verificou ainda seqüência de complementaridade parcial entre miR-10b e HOXD10 (<i>homeobox D10</i>). A expressão restaurada de HOXD10 em células MDA-MB-231 foi capaz de interferir na migração e na invasão <i>in vitro</i> , bem como na progressão tumoral <i>in vivo</i> .
HUYNH; JONES et al., 2014.	Transversal	miR-7	q-RT-PCR.	Os resultados deste estudo sugerem que o miR-7 pode desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência à terapia endócrina em pacientes com câncer de mama através da regulação da expressão de EGFR.
SHI et al., 2015.	Transversal	miR-7-5p	Imuno- histoquímica q-RT-PCR.	Os autores identificam REGy como alvo de miR-7-5p, havendo correlação inversa entre a expressão destes. A hiperexpressão de miR-7-5p inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose. Os resultados indicam que miR-7-5p tem uma função crítica por meio do bloqueio de REGy em células de câncer de mama.
OKUDA et al., 2013.	Cultura celular, Pré-clínico	miR-7	Microarray q-RT-PCR.	O estudo analisou o perfil de expressão de miR-7 em células tronco tumorais (CD24-/CD44+/ESA+) isoladas de células mamárias metastáticas. Os resultados demonstraram baixa expressão de miR-7 em células tronco tumorais (CTT) altamente metastáticas, sendo este miRNA capaz de modular um gene essencial para CTTs, o KLF4. Utilizando modelo animal, o estudo demonstrou ainda que modulando os níveis de miR-7, as CTTs tiveram capacidade suprimida de promover metástase para o cérebro, mas não foi verificado o mesmo no caso de metástase óssea. Os resultados da experiência <i>in vitro</i> sugerem que miR-7 atenua a capacidade de auto-renovação e de invasão nas CTTs por meio da modulação de KLF4. Os autores concluem que miR-7 e KLF4 possuem servir como biomarcadores ou alvos

terapêuticos em casos de metástases cerebrais em pacientes com câncer de mama.

MASUDA et al., Transversal
2012.

miR-7 q-RT-PCR.

Foi pesquisado o perfil de expressão de miRNAs induzidos por 17 β -Estradiol (E2) em linhagem celular MCF-7 de câncer de mama RE+. miR-7 foi associado significativamente a ação de estrógenos nestas células. O estudo analisou ainda a expressão de EGFR dependente de estrógeno por miR-7 em linhagens celulares de carcinoma de mama RE+ ou RE-, incluindo MCF-7. A transfeção de miR-7 em células MCF-7 resultou na supressão significativa de mRNA de EGFR. O estudo analisou ainda 41 amostras de câncer de mama, mas não foi demonstrada associação entre a expressão de miR-7 e de EGFR em células isoladas por microscopia. Os autores concluem que miR-7 possa desempenhar importante papel no desenvolvimento de resistência a terapia endócrina por meio da regulação de EGFR em pacientes com câncer de mama.

Q-RT-PCR: PCR quantitativa em tempo real; miR: MicroRNA; RE: Receptor de Estrógeno; RP: Receptor de Progesterona.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama foi categorizado como o segundo tipo de câncer mais incidente em todo o mundo e eleito como principal indutor de óbito em mulheres (IARC, 2016). No Brasil, estatísticas provenientes do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, apontaram o câncer de mama como o mais incidente na população feminina, registrando mais de 14 mil mortes pela doença no país durante o ano de 2013 (INCA, 2016).

O comportamento altamente heterogêneo desta doença inviabiliza precisões quanto aos aspectos de sobrevida e da melhor conduta terapêutica a ser estabelecida (MAXWELL, 2010). São diversas as condições que influenciam o comportamento singular apresentado por estes tumores e que predizem o tratamento a que cada paciente será candidata. Dentre estas características, destacam-se: (I) a expressão de receptores hormonais positivos, avaliados por meio de técnica imuno-histoquímica, e que torna a paciente elegível à terapia para receptores hormonais; (II) hiperexpressão do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), direcionando estes tumores a terapia dirigida por anticorpo monoclonal; e (III) tumores com ausência da expressão dos receptores hormonais e de HER2, sendo estes, candidatos ao tratamento sistêmico com uso de quimioterápicos convencionais. A quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, nas condições I e II, são aplicadas como tratamento neoadjuvante ou como terapia adjuvante em auxílio ao tratamento principal (REIS-FILHO; TUTT, 2008).

O BRCA1 é um gene supressor de tumor e reconhecido por sua associação ao câncer de mama e ovário (HARADA et al., 2013; LIU et al., 2016; SHI et al., 2017). Mais de duas mil mutações pontuais já foram descritas neste gene (HGMD, 2017). Além disso, mecanismos epigenéticos estão constantemente associados à expressão de BRCA1. Estudos recentes têm demonstrado BRCA1 silenciado em detrimento de metilação da região promotora (WU, 2016), e pela ação de reguladores pós-transcricionais, como os microRNAs (RAYCHAUDHURI et al., 2017). Alterações na expressão de miRNAs podem desencadear no bloqueio da tradução do RNA mensageiro pelo ribossomo ou mesmo induzir moléculas de mRNA alvo à degradação (MEISTER, 2011).

O estudo de microRNAs nas mais diferentes patologias tem sido amplamente realizado em escala mundial (LU et al., 2014), no entanto, ainda fazem-se necessárias novas pesquisas para contribuir com as discussões científicas acerca do seu mecanismo de atuação e implicação prognóstica. Poucos estudos brasileiros analisaram microRNAs em tumores de mama, não havendo nenhum registro de estudos que tenham contemplado a análise do perfil de expressão de hsa-miR-10b e hsa-miR-7 em pacientes acometidas pelo carcinoma de mama e a relação destes marcadores com a expressão de BRCA1.

Além da importante contribuição à ciência para subsidiar a elucidação da associação de miR-10b e miR-7 na sobrevida de pacientes com câncer de mama, este estudo é pioneiro na análise do perfil de expressão destes microRNAs em amostra composta por integrantes da população brasileira.

A heterogeneidade do câncer de mama reforça a importância do estudo de potenciais biomarcadores que auxiliem na individualização de estratégias terapêuticas de modo a personalizar os cuidados nas pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de microRNAs em amostras de carcinomas mamários provenientes do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás – ACCG.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever os aspectos clínicos e histopatológicos de mulheres com câncer de mama.
2. Avaliar a expressão da proteína BRCA1, nos tumores selecionados.
3. Estimar a sobrevida global das pacientes com câncer de mama.
4. Analisar as possíveis associações entre os fatores clinicopatológicos e a sobrevida em 60 meses de mulheres com câncer de mama.
5. Estimar a sobrevida de pacientes acometidas pelo câncer de mama em função da expressão de BRCA1.
6. Descrever o perfil de expressão de hsa-miR-7 e de hsa-miR-10b em carcinomas de mama.
7. Analisar as possíveis associações entre a expressão de hsa-miR-7 e hsa-miR-10b e o fenótipo tumoral triplo-negativo e não triplo-negativo.
8. Analisar as possíveis associações entre os perfis de expressão obtidos para BRCA1 e para os miRNAs avaliados e os aspectos clínicos e prognósticos observados nos dois grupos de pacientes.

4. METODOLOGIA

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge, em fevereiro de 2015, por meio do parecer consubstanciado nº 948.930 (Anexo C), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, instituição coparticipante, por meio do parecer consubstanciado nº 962.767 (Anexo D).

4.2. DELINEAMENTO METODOLÓGICO

Estudo epidemiológico transversal e analítico, retrospectivo, tipo caso-controle, utilizando prontuários e espécimes tumorais fixadas em formol e incluídos em parafina, de pacientes com câncer de mama provenientes do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG).

4.3. ELEGIBILIDADE DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA E COLETA DE DADOS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICO

O grupo de estudo foi selecionado a partir de 234 registros de imuno-histoquímica (IHQ) do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia/GO, nos anos de 2006 a 2007. Foram selecionados 92 casos de carcinomas de mama, sendo que 36 apresentaram fenótipo tumoral triplo-negativo e 56 não triplo-negativo. Todos os casos selecionados foram revisados por dois patologistas, que confirmaram o diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal e a presença de material tumoral.

A análise iniciou-se a partir da revisão dos registros de imuno-histoquímica, seguida dos prontuários. Os seguintes dados foram coletados: idade, data do diagnóstico, procedência, histórico familiar, paridade, análise da expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e receptor do fator de crescimento

epidérmico humano (HER2), tipo histológico, grau histológico e nuclear, localização tumoral, metástase, status linfonodal, classificação TNM, tratamento cirúrgico, tratamento adjuvante e neoadjuvante, data do último seguimento e condição da paciente na última consulta realizada (Apêndice A).

4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram: diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal da mama; dados clinicopatológicos disponíveis nos prontuários; seguimento clínico por cinco anos; ausência de tratamento neoadjuvante antes da biópsia ou cirurgia; tecido tumoral disponível no espécime incluído em parafina.

4.5. SELEÇÃO DOS MICRORNAS

A seleção dos microRNAs testados neste estudo foi realizada por meio de ferramenta computacional de previsão de microRNAs (miRBase). Dois microRNAs, hsa-miR-10b e hsa-miR-7 foram testados como potenciais miRNAs dirigidos para o RNA mensageiro de *BRCA1*.

4.6. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A expressão da proteína BRCA1 em espécimes de carcinoma ductal de mama foi analisada por meio de IHQ. Após a confirmação do diagnóstico histopatológico, foram confeccionadas lâminas para o estudo imuno-histoquímico, com emprego do método da imunoperoxidase associada a polímeros (*Reveal, DAB, Spring, Bioscience, Pleasanton, CA, EUA*) e anticorpos monoclonais anti-BRCA1 (SC-56030 BRCA1 GLK-2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). A metodologia utilizada para recuperação antigênica foi realizada por meio de solução de citrato em pH 6 na panela de pressão por 7 minutos. Utilizou-se o anticorpo na diluição 1:10. Para avaliar a positividade da expressão de BRCA1, foi estipulado um *cut-off* de 10% (AL-MULLA et al., 2005; CHEN et al., 2005; VAZ et al., 2007; GALIZIA et al., 2010; SHARMA et al., 2010; IWAMOTO et al., 2011). As lâminas que

apresentaram maior ou igual a 10% de células tumorais marcadas foram consideradas positivas para BRCA1. A marcação de BRCA1 foi considerada positiva quando a expressão nuclear e/ou citoplasmática estava presente. Conseqüentemente as lâminas que apresentaram menos de 10% de células tumorais marcadas foram consideradas negativas (AL-MULLA et al., 2005; CHEN et al., 2005; VAZ et al., 2007; GALIZIA et al., 2010; SHARMA et al., 2010; IWAMOTO et al., 2011).

4.7. ANÁLISE MOLECULAR

4.7.1. EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras selecionadas foram cortadas em micrótomo, gerando filamentos com espessura de cinco micrômetros, posteriormente foram desparafinizadas e submetidas à extração de microRNA. Para a extração de RNA foi feita uma etapa de desparafinização, utilizando xilol 100%, seguida de incubação por 15 minutos a 60° C em termobloco. Após a primeira incubação, retirou-se o xilol, com auxílio de pipeta semiautomática, e adicionou-se etanol 100% ao tubo. O material com etanol foi então levado ao termobloco a 60°C por mais 15 minutos e posteriormente centrifugado. Esse processo foi repetido duas vezes.

Foram utilizados cerca de 500µL do produto desparafinado para os passos subsequentes de extração de miRNAs, por meio do *kit miRNeasy FFPE (Qiagen N.V., Hilden, Alemanha)*, seguindo as orientações do fabricante (Anexo E).

Para a determinação da eficiência da extração e quantificação dos microRNAs, utilizou-se 1µL do produto da extração para leitura por espectrofotometria, por meio de um NanoDrop ND-2000 UV-vis *Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA)*. O produto de extração foi armazenado em microtubos a -80°C no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da ACCG, sendo retirado somente para realização das reações de transcrição reversa (síntese de cDNA).

4.7.2. SÍNTESE DE cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) consiste em uma técnica laboratorial que, por meio de utilização da enzima transcriptase reversa, transcreve uma sequência de RNA em cDNA. Para as reações de transcrição reversa do microRNA total extraído, foi utilizado o termociclador *Veriti 96 Well Thermal cycler* (*AppliedBiosystems™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*), em conformidade com as especificações do fabricante (Anexo F), e o kit comercial *miScript II RT kit* (*Qiagen N.V., Hilden, Alemanha*), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Determinou-se a eficiência da síntese de cDNA a partir da utilização de 1µL do produto gerado e submetido à leitura por espectrofotometria, utilizando um *NanoDrop ND-2000 UV-vis Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA*). A biblioteca de cDNAs produzida foi armazenada em freezer a -80°C, e retirada exclusivamente para diluição necessária às reações de PCR em tempo real.

4.7.3. PCR EM TEMPO REAL

A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em tempo real (qPCR) consiste de uma técnica laboratorial de amplificação – geração de múltiplas cópias de uma sequência de DNA, em escala exponencial, com resultados expressos no curso da reação. As análises das qPCRs foram realizadas utilizando o sistema de detecção *StepOne Real-time PCRs system* (*AppliedBiosystems™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*). Para a realização das qPCRs, foi utilizado o kit comercial *miScript SYBR® Green PCR* (*Qiagen N.V., Hilden, Alemanha*) em conjunto com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para os microRNAs hsa-miRNA-7 e hsa-miRNA-10b, fornecidos pelo kit *miScript Primer Assays* (*Qiagen N.V., Hilden, Alemanha*), segundo as orientações do fabricante (Anexo G).

Inicialmente, foi realizada a curva de calibração, avaliando a eficiência de amplificação de um *pool* composto pelas amostras de cDNA nas seguintes diluições seriadas: 1/0,3, 1/3, 1/30 e 1/300. As diferentes diluições do *pool* foram realizadas em conformidade com as informações geradas a partir da alimentação de dados no *StepOne Real-time PCRs System*, seguindo suas orientações de forma a obter a

concentração pretendida. O produto das diferentes diluições foi utilizado em duplicata juntamente com os *primers* para os microRNAs alvos: hsa-miR-10b, hsa-miR-7 e o controle endógeno RNU6, aplicados posteriormente em placa de 48 poços. Foram adicionados controles negativos e controles positivos, a fim de validar as reações. As diluições analisadas mostraram-se eficientes, com exceção daquela com menor concentração de cDNA (1/300). Em virtude disso, optou-se por realizar as reações com diluição de 1/30, onde se verificou amplificação e respectivo *plateau* nas curvas de amplificação. Desta forma, todas as amostras (cDNA) foram ajustadas para que a concentração inicial fosse de 120ng/ μ L em todas as reações. Cada reação contou com um controle positivo, um controle negativo, um marcador endógeno (RNU6) em duplicata, e duplicatas para os microRNAs alvo (miR-10b e miR-7).

4.8. ANÁLISE DE DADOS

Os resultados encontrados foram tabulados, calculando-se a média, mediana, variância, desvio padrão e posteriormente apresentados por meio de gráficos, quadros, tabelas e figuras. Foi realizado o teste do Qui-quadrado (X^2) com o Intervalo de Confiança (IC) de 95% para construção da tabela de contingência e da avaliação de sobrevida dos casos estudados.

A análise da variância foi realizada no software *GraphPadPrism 4.02 for Windows* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

As variáveis clínicas, histopatológicas e os resultados das análises moleculares foram comparadas e associadas à sobrevida em cinco anos pelo método de Kaplan-Meier (KM) e comparadas pelo teste de Log-rank.

Utilizou-se ainda o software *DataAssistTM* (AppliedBioSystemsTM, Life Technologies Carlsbad, CA, EUA), versão 3.01, para análise da expressão de miR-7 e miR-10b em comparação às características clinicopatológicas das pacientes estudadas. Os resultados das concentrações dos microRNAs, tanto hsa-miR-10b quanto hsa-miR-7, foram normalizados em função da expressão apresentada pelo

controle endógeno RNU6, gerando um ΔCt para cada reação, e o *fold change* foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para encontrar o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tomou-se a média dos valores de ciclagem (Ct) para o gene de manutenção e o gene testado em condições experimentais e de controle. Foram retornados quatro valores, sendo eles: microRNA testado experimentalmente (TE), microRNA testado como controle (TC), *Housekeeping* microRNA experimental (HE) e *Housekeeping* microRNA controle (HC). Foi calculada a diferença entre TE e HE (TE-HE) e entre TC e HC (TC-HC). Os resultados encontrados consistem em valores ΔCt em condição experimental (ΔCtE) e controle (ΔCtC). O $\Delta\Delta Ct$ foi observado ao calcular a diferença entre o ΔCtE e o ΔCtC ($\Delta CtE - \Delta CtC$). Por fim, calculou-se o $\Delta\Delta Ct$ elevado na base do algoritmo 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em função de cada variável analisada.

O resultado do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado ainda para aferir média, mediana, variância, desvio padrão e em seguida verificados Qui-quadrado (X^2) sob o Intervalo de Confiança (IC) de 95% em função das características patológicas apresentadas pelos tumores. O fluxograma da seleção dos casos analisados consta na Figura 14.

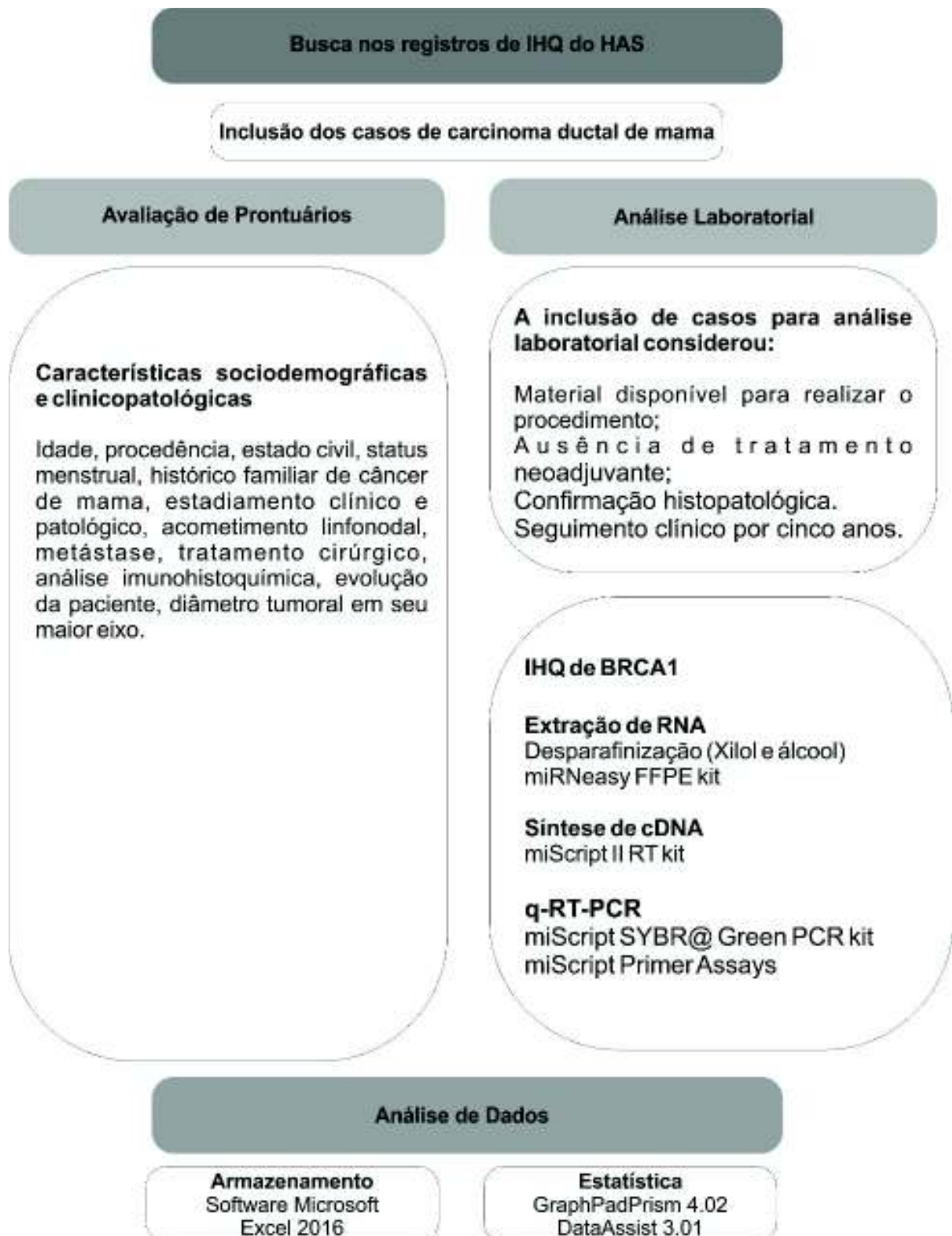


Figura 14. Fluxograma da seleção dos casos analisados.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA

A amostra que compôs o estudo foi selecionada a partir da análise de 234 registros de imuno-histoquímica de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, durante 2006 e 2007, no setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia/GO, conforme dispõe o fluxograma da Figura 15. Foram incluídos 92 casos de câncer de mama com material biológico disponível para análise de hsa-miR-7 e hsa-miR-10b e para a análise imuno-histoquímica de BRCA1.



Figura 15. Fluxograma da seleção de casos para o estudo.

5.2. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLINICOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA

O período de seguimento dos casos que compuseram o estudo variou de 4 a 111 meses, com média de 68,7 ($\pm 29,6$) meses para os 92 casos. A média de idade das pacientes foi de 54,6 ($\pm 13,8$) anos, sendo a idade mínima de 26 anos e a máxima de 83 anos. Destes casos, 37 (40,2%) foram diagnosticadas com câncer de mama antes dos 50 anos, e 55 (59,8%), com 50 anos ou mais. A maior parcela das mulheres era casada (51,1%) com diagnóstico após a menopausa (59,8%). Cerca de 14,1% da população estudada relatou histórico de câncer de mama familiar e 57,6% das pacientes eram residentes em cidades do interior do estado de Goiás e realizaram tratamento em Goiânia (Tabela 5).

Tabela 5. Análise descritiva das características sociodemográficas das mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

Variáveis	n	%
Idade ao diagnóstico		
<50	37	40,2
≥50	55	59,8
Estado civil		
Solteiras	18	19,6
Casadas	47	51,1
Outros	27	29,3
Status menstrual		
Menacmes	37	40,2
Menopausadas	55	59,8
Histórico de câncer de mama familiar		
Sim	13	14,1
Não	72	78,3
NR*	7	7,6
Origem		
Goiânia	32	34,8
Interior de Goiás	53	57,6
Outros Estados	7	7,6

*NR: Não relatado.

As características clinicopatológicas das amostras do estudo foram analisadas quanto ao fenótipo TN ou NTN. Pacientes acometidas por tumores triplo-negativo apresentaram média de idade de 50 ($\pm 11,6$) anos ao diagnóstico, enquanto

que os casos de pacientes com tumores não triplo-negativos (NTN) apresentaram média de idade de 57 ($\pm 14,4$) anos. Diferenças significativas entre os grupos não foram observadas em relação à idade ($p=0,271$), o status menstrual ($p=0,820$), o tabagismo ($p=0,666$), o tamanho tumoral ($p=0,364$), o grau histológico ($p=0,120$), o número de linfonodos comprometidos ($p=0,141$), o estadiamento clínico ($p=0,603$) e presença de metástase à distância ($p=0,566$) (Tabela 6).

Tabela 6. Aspectos clinicopatológicos de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama em função dos fenótipos TN e NTN, no ano de 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

Parâmetro	Triplo-negativo n=36 (39,1%)	Não triplo-negativo n=56 (60,9%)	p
Idade			
Média	50	57	
Varição	26-76	33-83	
< 50 anos	17 (47,2%)	20 (35,7%)	0,271
≥ 50 anos	19 (52,8%)	36 (64,3%)	
Status Menstrual			
Menacme	15 (41,7%)	22 (39,3%)	0,82
Menopausa	21 (58,3%)	34 (60,7%)	
Tabagismo			
Tabagistas	9 (25%)	15 (26,8%)	0,666
Não-tabagistas	26 (72,2%)	35 (62,5%)	
NR	1 (2,8)	6 (10,7)	
Tamanho do Tumor			
T1 ≤ 2cm	10 (27,8%)	11 (19,6%)	T1 × T2 e T3 0,364
T2 = 2cm até ≤ 5 cm	10 (27,8%)	26 (46,4%)	
T3 ≥ 5 cm	16 (44,4%)	19 (33,9%)	
Grau histológico			
I	6 (16,7%)	16 (28,6%)	I × II e III 0,120
II	14 (38,9%)	27 (48,2%)	
III	16 (44,4%)	8 (14,3%)	
NR	0	5 (8,9%)	
Número de Linfonodos			
0	13 (36,1%)	29 (51,8%)	0 × 1 ou mais 0,141
1 a 3	8 (22,2%)	17 (30,4%)	
4 a 9	8 (22,2%)	3 (5,4%)	
≥ 10	7 (19,4%)	7 (12,5%)	
Estadiamento clínico			
I	6 (16,7%)	5 (8,9%)	I e II × III e IV 0,603
II	10 (27,8%)	23 (41,1%)	
III	5 (13,8%)	8 (14,3%)	
IV	15 (41,7%)	20 (35,7%)	
Metástase à distância			

Presente	15 (41,7%)	20 (35,7%)	0,566
Ausente	21 (58,3%)	36 (64,3%)	

*NR: Não relatado.

5.3. EXPRESSÃO DE BRCA1 E CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

A expressão de BRCA1 foi analisada por meio de IHQ nos 92 casos, sendo negativa em 54 casos (58,7%) e positiva em 38 casos (41,3%). Associações significativas foram observadas entre a ausência da expressão de BRCA1 e ausência de receptores de estrógeno ($p=0,007$), ausência de receptores de progesterona ($p=0,016$), e fenótipo TN ($p=0,035$). Não foi demonstrada associação significativa entre a expressão de BRCA1 e a idade precoce ao diagnóstico ($p=0,1563$), mulheres em período anterior a menopausa ($p= 0,0644$), tamanho tumoral ($p=0,7339$), metástase linfonodal ($p=0,4098$), metástase à distância ($p=0,3907$), estadiamento clínico ($p= 0,3568$), grau histológico ($p=0,9587$) ou ausência do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) ($p= 0,0736$) (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação da expressão de BRCA1 parâmetros clinicopatológicos de mulheres diagnosticadas com carcinoma mama entre 2006 e 2007 em Goiânia-GO.

Parâmetro	BRCA1 neg n= 54 (58,7%)	BRCA1 pos n=38 (41,3%)	p
Idade			
< 50 anos	25 (46,3%)	12 (31,6%)	0,1563
≥ 50 anos	29 (53,7%)	26 (68,4%)	
Status Menstrual			
Menacme	26 (48,1%)	11 (28,9%)	0,0644
Menopausa	28 (51,9%)	27 (71,1%)	
Tamanho do Tumor			
T1	13 (24,1%)	8 (21,1%)	0,7339
T2,T3,T4	41 (75,9%)	30 (78,9%)	
Metástase linfonodal			
Presente	28 (51,9%)	23 (60,5%)	0,4098
Ausente	26 (48,1%)	15 (39,5%)	
Metástase à distância			
Presente	18 (33,3%)	16 (42,1%)	0,3907
Ausente	36 (66,7%)	22 (57,9%)	
Estadiamento Clínico			
I e II	28 (51,9%)	16 (42,1%)	0,3568
III e IV	26 (48,1%)	22 (57,9%)	
Grau histológico			
I	13 (24,1%)	9 (23,7%)	0,9587
II e III	38 (70,4%)	27 (71,0%)	
NR*	3 (5,5%)	2 (5,3%)	
Receptor de Estrógeno			
Positivo	20 (37,0%)	25 (65,8%)	0,0066**
Negativo	34 (63,0%)	13 (34,2%)	
Recepto de Progesterona			
Positivo	19 (35,2%)	23 (60,5%)	0,0163**
Negativo	35 (64,8%)	15 (39,5%)	
Receptor de HER2			
Positivo	12 (22,2%)	15 (39,5%)	0,0736
Negativo	42 (77,8%)	23 (60,5%)	
Fenótipo tumoral			
NTN	28 (51,9%)	28 (73,7%)	0,0346**
TN	26 (48,1%)	10 (26,3%)	

*NR: Não relatado.

** Associações significativamente significativas (p<0,0500).

5.4. ASPECTOS PROGNÓSTICOS: ANÁLISE DE SOBREVIDA

Os dados clinicopatológicos foram utilizados para elaboração de curvas de sobrevida das pacientes com acompanhamento de 60 meses (cinco anos). Ao longo deste período, 27,2% das pacientes acometidas pelo câncer de mama foram a óbito, com causa diretamente relacionada à doença (Figura 16).

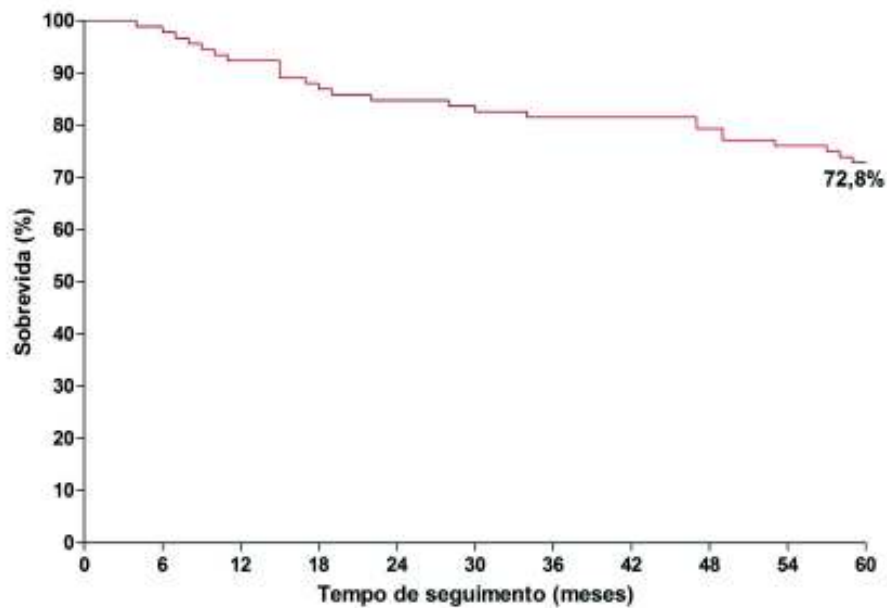


Figura 16. Análise de sobrevida global em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

A análise da sobrevida em 60 meses, em função do fenótipo tumoral foi de 80,4% para o grupo de pacientes NTN e de 61,1% para os casos TN ($p=0,043$), demonstrando associação entre o perfil TN e pior prognóstico das pacientes (Figura 17).

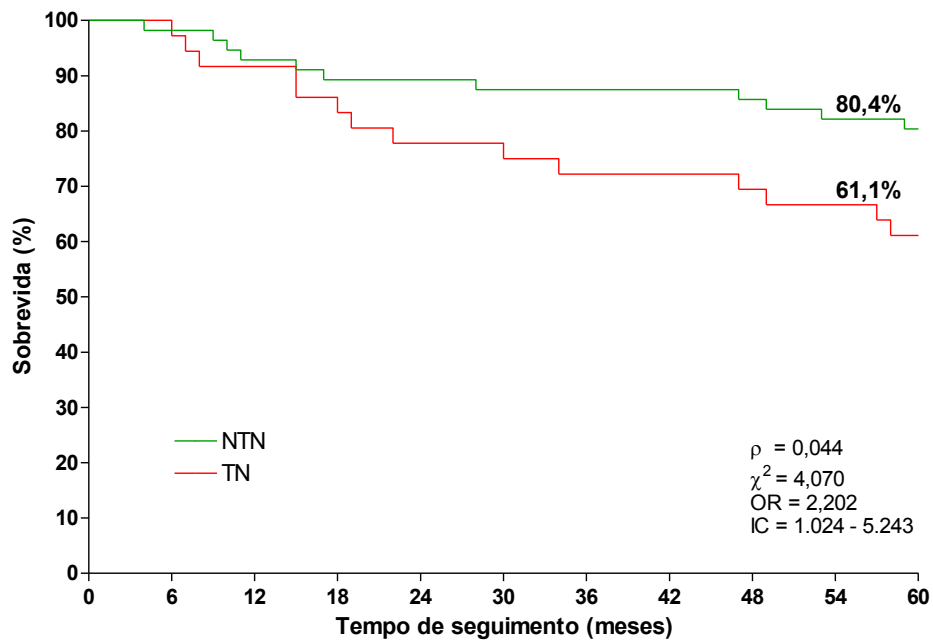


Figura 17. Análise de sobrevida em 60 meses em função do fenótipo tumoral de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

A sobrevida em 60 meses para as pacientes com idade inferior a 50 anos foi de 70,9% e não diferiu significativamente daquelas com idade igual ou superior a 50 anos (75,7%) ($p=0,715$) (Figura 18).

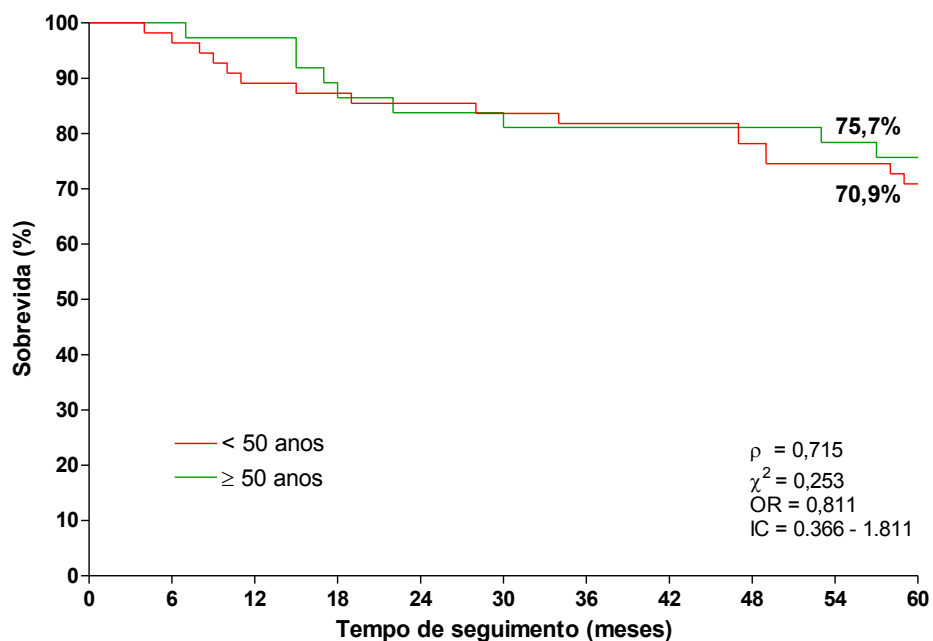


Figura 18. Análise de sobrevida em 60 meses em função da idade para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

Em relação ao estadiamento clínico, as pacientes nos estádios I e II apresentaram maior sobrevida (86,4%) que as pacientes nos estádios III e IV (60,4%)($p=0,005$), demonstrando associação entre os estádios mais avançado e o pior prognóstico para as pacientes com câncer de mama (Figura 19).

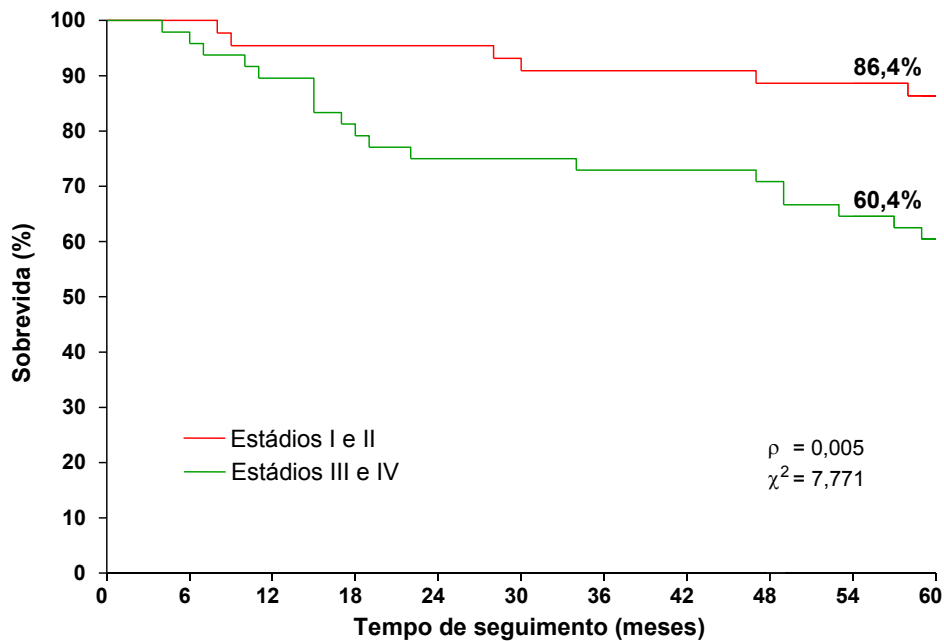


Figura 19. Análise de sobrevida em 60 meses em função do estadiamento clínico para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

Quanto ao acometimento por metástase linfonodal, os casos metastáticos apresentaram pior sobrevida (64,7%) quando comparados aos casos não metastáticos (82,9%) ($p=0,038$) (Figura 20).

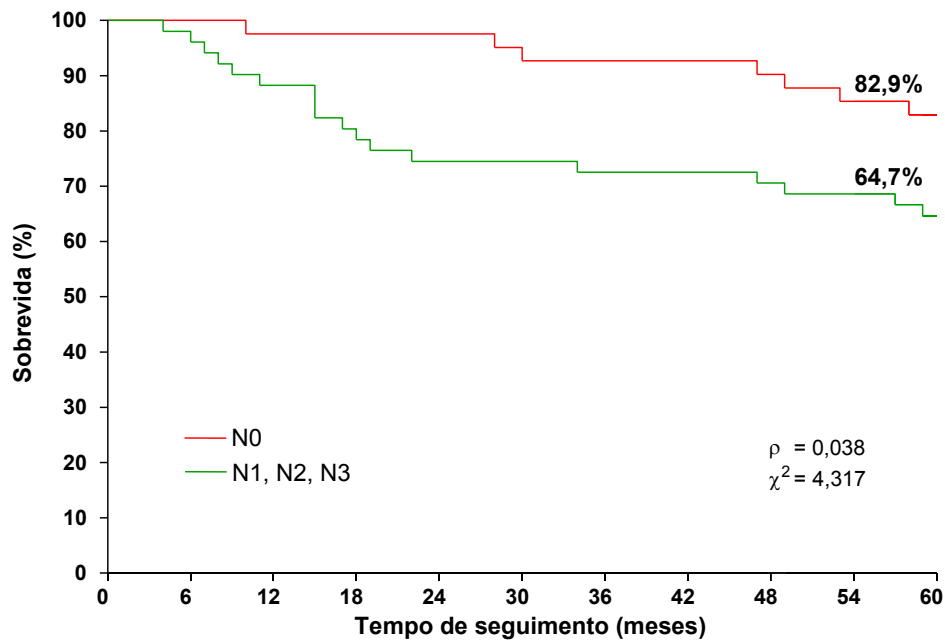


Figura 20. Análise de sobrevida em 60 meses em função do acometimento linfonodal para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

A sobrevida das pacientes em 60 meses foi avaliada ainda em relação ao desenvolvimento de metástase à distância. Verificou-se uma queda significativa na sobrevida de pacientes acometidos pela doença metastática (52,9%) ($p=0,0008$) (Figura 21).

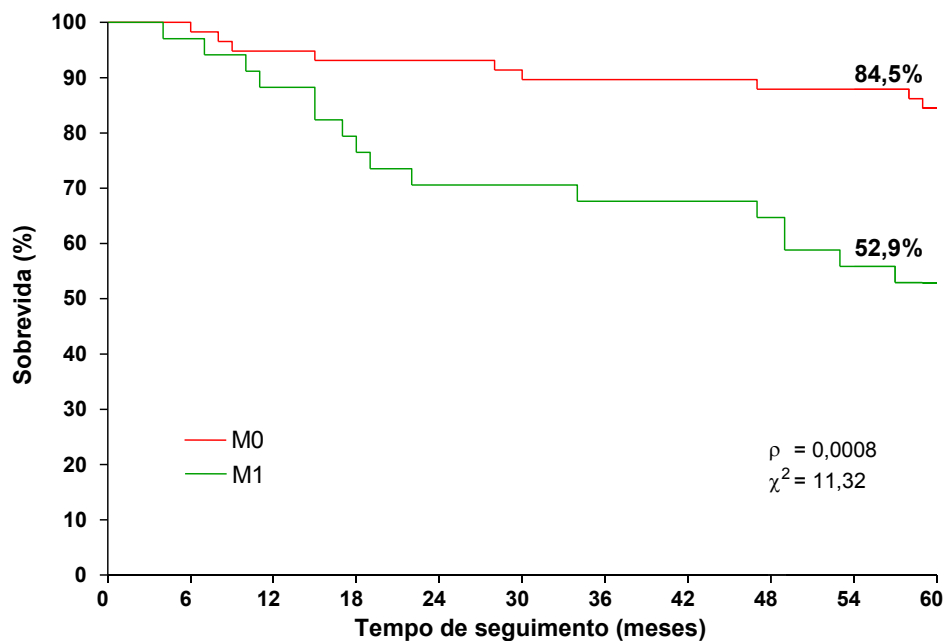


Figura 21. Análise de sobrevida em 60 meses em função do desenvolvimento de metástase à distância para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO. M0: Sem metástase; M1: Com metástase.

A sobrevida em 60 meses para as pacientes com câncer de mama foi avaliada em relação à expressão de BRCA1. A ausência da expressão deste marcador foi associada ao pior prognóstico das pacientes (57,6%) ($p=0,039$) (Figura 22).

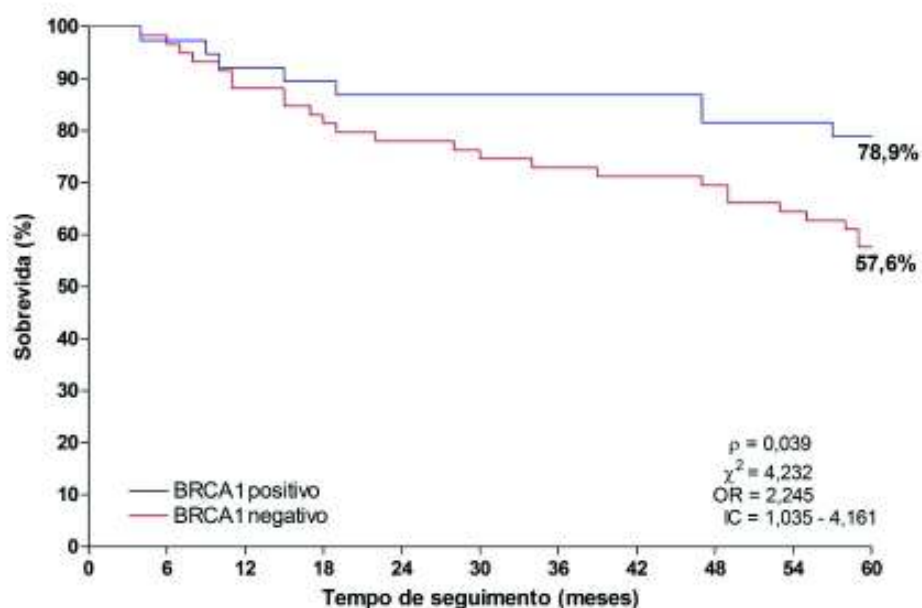


Figura 22. Análise de sobrevida em 60 meses em função da expressão de BRCA1 para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

5.5. EXPRESSÃO DE MIR-10B E MIR-7

A purificação de microRNAs gerou amostras com concentração média de 132,9 ($\pm 181,1$) ng/ μ L, variando entre 14,3 a 728,9. O produto de cDNA, proveniente do microRNA extraído, gerou uma concentração média de 898,1 ($\pm 324,7$) ng/ μ L com variação de 23,4 a 1786,2. A PCR em tempo real foi realizada inicialmente para definição da curva de calibração e verificação da melhor concentração de cDNA a ser utilizada. A expressão dos microRNAs foi avaliada por meio do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A expressão de miR-10b no grupo de amostras variou de 0,001 a 3,239 ($\pm 0,432$) com mediana de 0,019. A mediana da expressão de miR-7 foi de 0,013, variando de 0,001 a 33,458 ($\pm 3,683$).

As análises por PCR quantitativa em tempo real demonstraram diferentes níveis de expressão de miR-7 e miR-10b no grupo de tumores avaliados neste trabalho. Com base nos resultados obtidos, comparou-se a expressão de miR-7 e miR-10b em função do fenótipo tumoral triplo-negativo e não triplo-negativo. Uma diferença significativa foi demonstrada para a expressão de miR-7 ($p=0,042$) e de miR-10b ($p=0,021$) nos casos de pacientes com tumores TN e NTN (Figura 23).

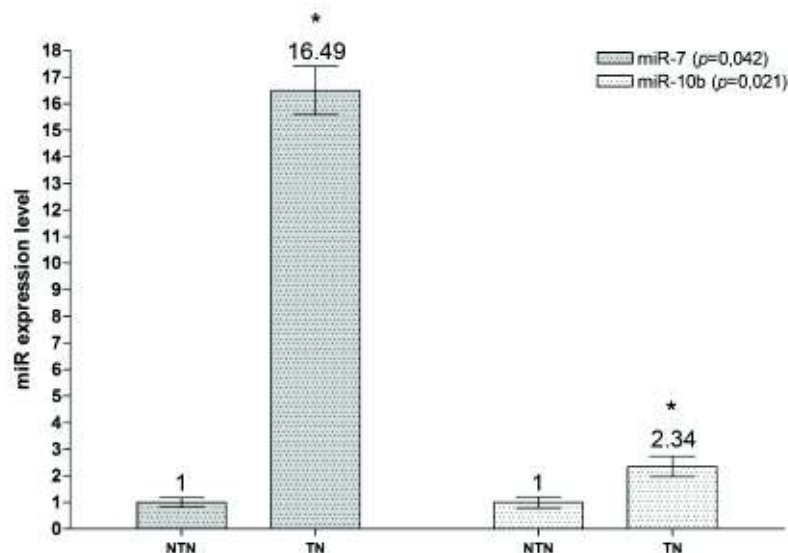


Figura 23. Comparação da expressão de miR-7 e miR-10b em função do fenótipo tumoral para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

Diferenças significativas para expressão de miR-7 ($p=0,006$) e de miR-10b ($p=0,039$) foram detectadas em tumores positivos e negativos para a expressão de BRCA1 (Figura 24).

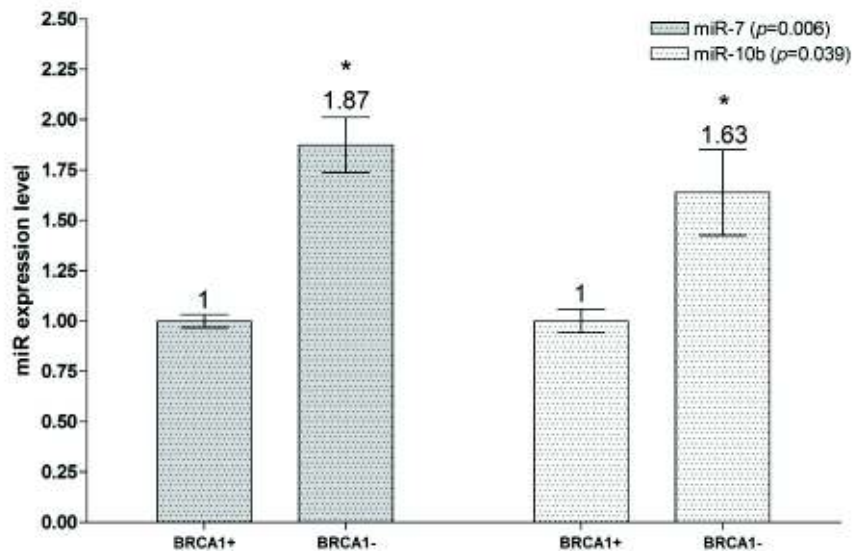


Figura 24. Comparação da expressão de miR-7 e miR-10b em função da expressão de BRCA1 para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

Uma diferença estatística foi demonstrada para a expressão de miR-7 ($p=0,031$) nos casos de pacientes com tumores HER2+ e HER2- (Figura 25). A diferença para a expressão de miR-10b nestes casos não foi estatisticamente diferente ($p=0,926$).

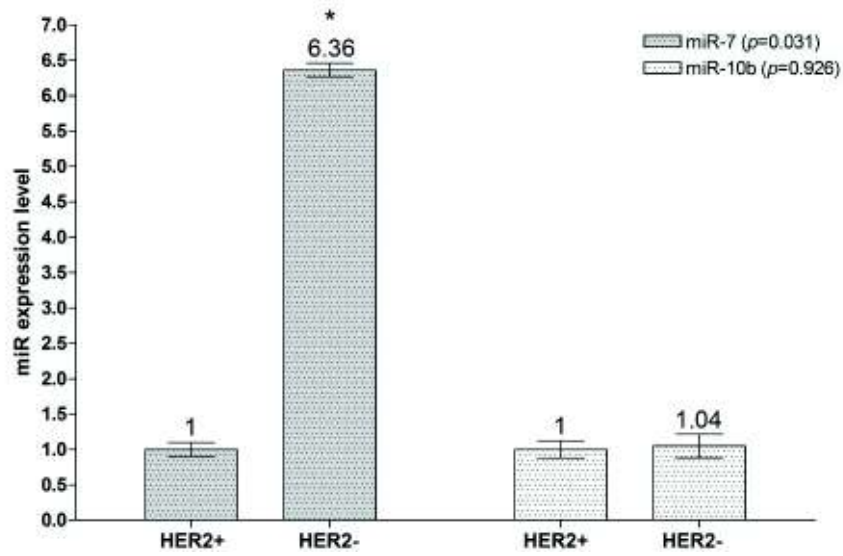


Figura 25. Comparação da expressão de miR-7 e miR-10b em função da expressão de HER2 para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, entre 2006 e 2007, em Goiânia-GO.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram uma associação inversa entre a expressão de hsa-miR-7 e hsa-miR-10b e a expressão de BRCA1, analisada por IHQ (Figura 24), confirmando a hipótese inicial da nossa investigação. A expressão de hsa-miR-7 e hsa-miR-10b também foram associadas ao fenótipo tumoral triplo-negativo (Figura 23).

Os fatores prognósticos determinantes no câncer de mama incluem o estadiamento tumoral, o tipo e o grau histológico, as características imuno-histoquímicas, a metástase à distância e o acometimento linfonodal, entretanto, pesquisas têm sido realizadas para identificar novos biomarcadores capazes de melhor definir e contextualizar o prognóstico de pacientes acometidas por esta doença que se caracteriza por vasta heterogeneidade (AZIZ et al., 2001). A sobrevida global das pacientes com câncer de mama avaliadas neste estudo foi de 72,8%. Achados semelhantes foram observados na população de Juiz de Fora, Brasil (GUERRA et al., 2009), e em estudo na população goiana (STIVAL et al., 2012). Outros fatores, considerados como clássicos no prognóstico do câncer de mama foram observados em nosso estudo, havendo associações significativas com pior sobrevida das pacientes que apresentaram fenótipo triplo-negativo, doença em estádios mais avançados, acometimento linfonodal e presença de metástase à distância, concordando com estudo que também investigou a população de Goiânia (STIVAL et al., 2012) e estudos internacionais (NGOWA et al., 2015). Além disso, o presente estudo avaliou a sobrevida em 60 meses em função da expressão de BRCA1, demonstrando pior prognóstico para os casos com ausência da expressão deste marcador (Figura 21).

Diversos mecanismos são descritos para a regulação da expressão de BRCA1, destacando-se mutações pontuais (HGMD, 2017), metilação da região promotora do gene (WU, 2016) e fatores pós-transcricionais (QUANN; JING; RIGOUTSOS, 2015). Cada um desses mecanismos desempenha importantes efeitos na regulação de BRCA1 e conseqüentemente nas suas funções de supressor tumoral (CHANG; SHARAN, 2013; QUANN; JING; RIGOUTSOS, 2015; WU, 2016; HGMD, 2017). Ainda que os fatores clássicos sejam utilizados para análise

prognóstica e alguns como aspectos preditivos, há intensa necessidade de identificar marcadores mais eficazes que possam auxiliar no entendimento do comportamento tumoral.

Uma metanálise composta por nove estudos (3.205 pacientes) demonstrou uma associação significativa entre a metilação de BRCA1 e o pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (WU et al., 2013). Outra metanálise, avaliando a metilação da região promotora de BRCA1 em pacientes com câncer de mama, demonstrou associação entre a ausência deste marcador e a ausência de RE, RP e HER2 (GUO et al., 2015).

A perda de função em BRCA1 devido a mutações pontuais ou seu silenciamento, leva ao acúmulo de lesões na cadeia em outros genes e subsequentemente oportunizam a carcinogênese (LAX, 2017). Estudos têm demonstrado alta incidência de mutação de BRCA1 e proteínas importantes, incluindo PALB2, BARD1, BRIP1, RAD51C e RAD51D em sua atuação, em pacientes com câncer de mama triplo negativo em relação aos demais fenótipos tumorais, o que favorece a agressividade verificada nestes tumores e naqueles que demonstram silenciamento deste gene (AFGHAHI; TELLI; KURIAN, 2016; GACEB et al., 2017; LIU et al., 2017). Severas implicações clínicas são verificadas em pacientes com mutações e silenciamento de BRCA1, devido ao acúmulo de novas mutações em outros genes em virtude da falta de reparo, favorecendo a progressão tumoral e conseqüentemente levando a uma pior sobrevida nesta população (LIU et al., 2017).

Entretanto, existem outros fatores que colaboram para o silenciamento de BRCA1, dentre eles, a ação dos microRNAs, pequenas moléculas compostas por aproximadamente 21 nucleotídeos, capazes de se ligar a extremidade 3' não traduzida de mRNAs, levando à degradação ou inibindo o processo de tradução desses mRNAs (MEISTER, 2011; HATA; KASHIMA, 2015).

Os microRNAs têm sido descritos na literatura como importantes reguladores transcricionais e correlacionados a diferentes níveis de expressão nos mais diversos tipos de câncer, sendo eles, fortes candidatos no processo de oncogênese e também na supressão de tumores (HALVORSEN et al., 2017; WUA et al., 2017). Neste sentido, a pesquisa de reguladores de BRCA1 pode esclarecer o

conhecimento acerca do comportamento biológico dos tumores de mama, bem como auxiliar no entendimento do conjunto de fatores e vias de sinais envolvidos na carcinogênese.

Os níveis de expressão de miR-10b foram avaliados em diferentes tumores e uma metanálise, incluindo 36 estudos (LU et al., 2014), revelou altos níveis de expressão em schwannomas vestibulares e níveis mais baixos em melanoma. Em cânceres de mama e hepatocelulares, a expressão de miR-10b foi conflitante e nenhum resultado estatístico significativo pôde ser concluído (LU et al., 2014).

Alguns estudos demonstram que a expressão de miR-10b relaciona-se com o processo de metástase, conferindo à célula mamária tumoral maior capacidade migratória e de invasão (MEDIMEGH et al., 2014; KNIRSH et al., 2016; M'HAMED et al., 2017). Um estudo comparou a expressão de 353 diferentes microRNAs em células-tronco tumorais luminais e basais de câncer de mama e em linhagens de células MCF-7 e MDA-MB-231. A quantificação de miR-10b demonstrou que este microRNA estava hiperexpresso em comparação aos demais miRNAs analisados (BAHENA-OCAMPO et al., 2016). Esta hiperexpressão conferia às células maior capacidade de auto-renovação, migração e transição epitélio-mesenquima. A inibição da expressão de miR-10b a partir de microRNA antisense sintético, neste mesmo estudo, resultou na diminuição da auto-renovação das células tumorais. Recursos de bioinformática identificaram múltiplos alvos de hsa-miR-10b, incluindo fosfatase homóloga a tensina (PTEN), que é responsável pela regulação da via PI3K / AKT, que por sua vez se relaciona com o processo metastático, perda de mecanismos apoptóticos e auto-renovação. O estudo constatou ainda que a depleção de miR-10b resultou no aumento da expressão de PTEN, diminuindo a atividade de AKT, e conseqüentemente contribuindo para o processo de metástase (BAHENA-OCAMPO et al., 2016). Outro estudo enfocou a atuação de c-Jun, um proto-oncogene que atua como fator de transcrição estimulando a proliferação e progressão tumoral em células metastáticas com perda de E-caderina. O aumento da expressão de miR-10b levou ao aumento de c-Jun, através da via RhoC e NF1, favorecendo o aparecimento de metástases (KNIRSH et al., 2016).

Quanto ao miR-7, um estudo constatou seu papel como um supressor tumoral, pois ao reestabelecer seus níveis em células MCF-7/ HER2D16, observou

supressão da proliferação e migração celular, além da sensibilização destas células à terapia com trastuzumab (HUYNH; JONES, 2014). Outro estudo importante demonstrou que baixos níveis de miR-7 em células tronco tumorais de linhagens de células de mama metastáticas estavam associados ao desenvolvimento de metástase óssea e cerebral (OKUDA et al., 2013). Utilizando modelo animal, demonstrou-se que miR-7 suprimiu significativamente a capacidade das células-tronco em estabelecerem metástases no cérebro, contudo o mesmo não foi demonstrado no caso de metástase óssea. Os resultados indicam ainda o papel de miR-7 em atenuar a capacidade de invasão e auto-renovação destas células modulando a expressão de KLF4 (*Kruppel Like Factor 4*) (OKUDA et al., 2013).

A alta expressão de miR-10b sugere pior prognóstico em alguns tipos de tumores, havendo conclusões conflitantes quanto ao câncer de mama (LU et al., 2014), enquanto que miR-7 demonstra uma relação com a supressão tumoral (OKUDA et al., 2013; HUYNH; JONES, 2014). Nossos resultados demonstraram uma regulação inversa entre a expressão dos microRNAs analisados (miR-7 e miR-10b) e a expressão de BRCA1 (Figura 24). O miR-10b foi expresso, aproximadamente, duas vezes mais em tumores de mama TN negativo, o que reflete a maior agressividade apresentada por estes tumores ($p=0,021$). Esse achado corrobora com o observado em outro estudo que avaliou 24 tumores TN e 13 NTN, com a expressão de miR-10b 1,3 vezes maior nos casos TN. Porém, em função do reduzido número de casos analisados (37 pacientes), essa diferença não pode ser estatisticamente comprovada (M'HAMED et al., 2017).

No presente estudo, a alta expressão de miR-7 foi associada à ausência de BRCA1 ($p=0,006$) (Figura 24), ao fenótipo TN ($p=0,042$) (Figura 23) e à ausência de HER2 ($p=0,031$) (Figura 25). Um estudo com cultura de células MCF-7/ HER2D16, HER2 negativo, observou uma relação inversa proporcional entre a expressão de HER2 e a expressão de miR-7 (HUYNH; JONES, 2014), sugerindo que miR-7 seja capaz de modular a expressão de HER2 (Figura 25).

No curso deste estudo, algumas limitações foram identificadas, como o tamanho amostral e a relativa falta de dados em prontuários, impossibilitando a análise de um grupo maior. A terceirização, um procedimento do Hospital Araújo Jorge, que se pauta no encaminhamento de material biológico de outras instituições

para análise em laboratório, resultou em grande perda de casos da população do estudo em virtude da insuficiência de material biológico para realização de novos procedimentos em pesquisa. Além disso, dentre os blocos parafinizados existentes, houve um grande número de casos excluídos devido à escassez de material ou tecido tumoral para realização da análise molecular e imuno-histoquímica. Em respeito ao compromisso ético firmado com a instituição de não esgotar o material tumoral, que pode ser solicitado para reanálise ou análise de novo marcador, a critério do médico responsável ou do paciente, estes blocos foram devidamente excluídos do estudo. Todavia, diversos estudos que analisaram expressão de microRNAs, trabalharam com pequeno grupo amostral de pacientes com câncer de mama (MASUDA et al., 2012; M'HAMED et al., 2017). Outro fator importante está relacionado à microdissecção não realizada em nosso estudo, o que resultaria em melhor seleção das células tumorais em relação ao tecido normal adjacente.

Recursos de bioinformática têm sido amplamente aplicados aos estudos envolvendo microRNAs. Sabe-se que uma única molécula de miRNA é capaz de se ligar a múltiplos mRNAs alvos, dificultando a compreensão sobre seu mecanismo de ação e as vias biológicas afetadas. Apesar das pesquisas em larga escala, ainda permanecem obscuras todas as vias de atuação dos miRNAs (MEISTER, 2011; MASUDA et al., 2012; OKUDA et al., 2013; HUYNH; JONES et al., 2014; KALNIETE et al., 2015; SHI et al., 2015; WANG ET AL., 2016; M'HAMED et al., 2017). São necessários estudos abordando maior número de pacientes com câncer de mama, a fim de comprovar o papel de miR-10b e miR-7 como possíveis biomarcadores e preditores prognóstico e sua associação aos aspectos clinicopatológicos. Além disso, estudos com linhagens celulares de câncer de mama com BRCA1 selvagem e BRCA1 silenciado, seguidos da transfecção de miR-10b e miR-7 são necessários para constatação do papel desses microRNAs e relação com a regulação gênica de BRCA1 e outros genes.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A maior parte das pacientes do estudo tinha 55 (59,8%) anos ou mais, 36 (39,1%) apresentavam tumores com fenótipo triplo-negativo.
- ✓ A expressão de BRCA1 foi positiva em 38 (41,3%) casos e negativa em 54 (58,7%) casos analisados. Associações significativas foram demonstradas entre a ausência de BRCA1 e o fenótipo triplo-negativo.
- ✓ A sobrevida global em 60 meses das pacientes acometidas por carcinoma de mama foi de 72,8%.
- ✓ A sobrevida em cinco anos foi inversamente associada ao fenótipo triplo-negativo, aos estádios clínicos III e IV, à presença de metástase linfonodal e à presença de metástase à distância.
- ✓ A sobrevida em cinco anos foi inversamente associada à expressão de BRCA1.
- ✓ A hiperexpressão de hsa-miR-7 e de hsa-miR-10b foi associada ao fenótipo triplo-negativo.
- ✓ A hiperexpressão de hsa-miR-7 e de hsa-miR-10b foi inversamente associada à expressão de BRCA1.
- ✓ A hiperexpressão de hsa-miR-7 foi também associada à ausência da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2).

7. REFERÊNCIAS

ABREU, Evaldo De; KOIFMAN, Sérgio. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.L], 48(1): 113-131, 2002.

AFGHAHI, Anosheh; TELLI, Melinda L.; KURIAN, Allison W.. Genetics of triple-negative breast cancer: Implications for patient care. **Curr Probl Cancer**., Doi: 10.1016/j.currprobcancer.2016.09.007., v. 40, n. 2, p. 130–140, mar./ago. 2016.

AL-MULLA, F. et al. BRCA1 Gene Expression in Breast Cancer: A Correlative Study between Real-time RT-PCR and Immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**., DOI: 10.1369/jhc.4A6544.2005, v. 53, n. 5, p. 621–629, mai. 2005.

ALIM, Nural Erzurum; KIZILTAN, Gul. Assessment of Risk Factors of Obesity and Diet on Breast Cancer in Ankara, Turkey. **Pak J Med Sc**, Doi: <https://doi.org/10.12669/pjms.326.11346>, v. 32, n. 6, p. 1537-1542, out. 2016.

AMORIM, M. et al. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. **J Transl Med**., DOI 10.1186/s12967-016-1025-3, v. 14, n. 265, p. 1-15, set. 2016.

AZIZ, S. A. et al. Significance of Immunohistochemical c-ErbB-2 Product Localisation Pattern for Prognosis in Human Breast Cancer. **PATHOLOGY ONCOLOGY RESEARCH**, [S.L], v. 7, n. 3, p. 191-196, jun. 2001.

BAHENA-OCAMPO, I. et al. MiR-10b expression in breast cancer stem cell supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation. **EMBO reports**, DOI 10.15252/embr.201540678, v. 17, n. 5, p. 648-658, abr. 2016.

BAO J. et al. The Effect of Laterality and Primary Tumor Site on Cancer-Specific Mortality in Breast Cancer: A SEER Population-Based Study. **PLoS ONE** 9(4): e94815. doi:10.1371/journal.pone.0094815. 2014.

BARROS, A. C. S. D. et al. **Projeto diretrizes: Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama**. [S.L.]: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2001. 1-15 p.

BERG, W. A.; BIRALWELL, R. L.; GOMBOS, E.; WANG, S. C.; PARKINSON, B.; RAZA, S.; GREEN, G.; KENNEDY, A.; KETTLER, M. D. **Diagnostic Imaging, Breast**. 1ª Ed. Salt Lake City: Amirsys, 2006.

BERNARDES, A. **Manual de ginecologia: Anatomia da mama feminina**. Lisboa: Permanyer Portugal, 2011. 167-174 p.

BERSE, B.; LYNCH, J. A.. MOLECULAR DIAGNOSTIC TESTING IN BREAST CANCER. **Elsevier Inc.**, <Http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2015.02.008>, v. 31, n. 2, p. 108–121, mai. 2015.

BOUKERROUCHA, M. et al. Evaluation of BRCA1-related molecular features and microRNAs as prognostic factors for triple negative breast cancers. **BMC Cancer**, [S.L], out. 2015.

BOYLE, P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. **Ann Oncol**, Doi:10.1093/annonc/mds187, v. 23, n. 6, p. vi7–vi12, ago. 2012.

BRISKEN, Cathrin; O'MALLEY, Bert. Hormone Action in the Mammary Gland. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, [S.L], v. 2, n. 12, p. 1-15, dez. 2010.

BUITRAGO, Farid; UEMURA, Gilberto; SENA, Maria Cristina Ferreira. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com. Ciências Saúde**, [S.L], v. 22, n. 1, p. :S69-S82, jan. 2011.

CAVA, C. et al. How interacting pathways are regulated by miRNAs in breast cancer subtypes. **BMC Bioinformatic**, DOI: 10.1186/s12859-016-1196-1, v. 17, n. 12, p. 183-212, nov. 2016.

CHANG, Suhwan; SHARAN, Shyam K.. The role of epigenetic transcriptional regulation in BRCA1-mediated tumor suppression. **Transcription**, [S.L], v. 4, n. 1, p. 24-28, jan./fev. 2013.

CHEN, Y. et al. BRCA1 promoter methylation associated with poor survival in Chinese patients with sporadic breast cancer. **Cancer Sci.**, Doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01225.x., v. 100, n. 9, p. 1663-1667, mai. 2005.

CHUFFA, L. G. D. A. et al. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. **Elsevier**, [Http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2016.12.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2016.12.011), v. 118, p. 93–108, fev. 2017.

COUTO, H. L.; REIS, F. M.; CASSALI, G. D. Expressão e Localização da Folistatina e *FLRG* (gene relacionado a folistatina) na mama normal e patológica. Belo Horizonte: **Biblioteca Digital UFMG**, 2007.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

DANZA, K.; Summa, S.; Pilato, B.; Carella, M.; Palumbo, O.; Popescu, O.; Paradiso, A.; Pinto, R.; Tommasi, S. Combined microRNA and ER expression: a new classifier for familial and sporadic breast cancer patients. **Journal of translational medicine**. 2014.

DENG, Chu-Xia; BRODIE, Steven G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Elsevier**, DOI: 10.1006/scbi.2001.0394, v. 11, n. 5, p. 387–394, out. 2001.

DENSHAM, Ruth M; MORRIS, Joanna R. The BRCA1 Ubiquitin ligase function sets a new trend for remodelling in DNA repair. **Nucleus**, [S.L], nov. 2016. Disponível em: <doi.org/10.1080/19491034.2016.1267092>. Acesso em: 01 fev. 2017.

EICHELSER, C. et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. **Oncotarget**, [S.L], v. 5, n. 20, out. 2014.

FELICIO, P. S. et al. Genetic and epigenetic characterization of the BRCA1 gene in Brazilian women at-risk for hereditary breast cancer. **Oncotarget**, [S.L], v. 8, n. 2, p. 2850-2862, dez. 2016.

FIGUEIREDO, Euridice; MONTEIRO, Mauro; FERREIRA, Alexandre. Tratado de oncologia. 1 ed. [S.L.]: REVINTER, 2013.

FITZGIBBONS, P. L. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**, [S.L], v. 124, n. 7, p. 966-978, jul. 2010.

FORCADOS, G. E. et al. Oxidative Stress and Carcinogenesis: Potential of Phytochemicals in Breast Cancer Therapy. **Nutr Cancer**, Doi: 10.1080/01635581.2017.1267777, p. 1-10, jan. 2017.

FREITAS-JUNIOR, R. et al. Contribution of the Unified Health Care System to mammography screening in Brazil, 2013. **Radiol Bras**, Doi.org/10.1590/0100-3984.2014.0129, v. 49, n. 5, p. 305–310, set./out. 2016.

FREITAS-JÚNIOR, R. et al. Trends in breast cancer surgery at Brazil's public health system. **J Surg Oncol**, DOI 10.1002/jso.24572, p. 1-6, jan. 2017.

GABRIELY, G.; Teplyuk, N. M.; Krichevsky, A. M. Context effect: microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death. **Autophagy**. 2011.

GACEB, H. et al. Clinicopathological and Molecular Study of Triple-Negative Breast Cancer in Algerian Patients. **Pathol Oncol Res.**, [S.L], mai. 2017. Disponível em: <doi: 10.1007/s12253-017-0242-2>. Acesso em: 30 mai. 2017.

GALIZIA, E. et al. BRCA1 expression in triple negative sporadic breast cancers. **Anal Quant Cytol Histol.**, [S.L], v. 32, n. 1, p. 24-29, fev. 2010.

GOLUBNITSCHAJA, O. et al. Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. **Tumour Biol.**, DOI: 10.1007/s13277-016-5168-x, v. 37, n. 10, p. 12941-12957, out. 2016.

GONZAGA, C. M. R. et al. Temporal trends in female breast cancer mortality in Brazil and correlations with social inequalities: ecological time-series study. **BMC Public Health**, DOI 10.1186/s12889-015-1445-7, v. 15, n. 96, p. 1-9, fev. 2015.

GOSS, C. M. **Gray anatomia**. 29^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.

GUERRA, M. R. et al. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, [S.L], v. 25, n. 11, p. :2455-2466, nov. 2009.

GUO, T. et al. Promoter methylation of BRCA1 is associated with estrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptor-negative tumors and the prognosis of breast cancer: A meta-analysis. **Mol Clin Oncol.**, DOI: 10.3892/mco.2015.620, v. 3, n. 6, p. 1353-1360, nov. 2015.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E **Tratado De Fisiologia Médica**. 12° Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1063-1079 p.

HALVORSEN, A. R. et al. Profiling of microRNAs in tumor interstitial fluid of breast tumors - a novel resource to identify biomarkers for prognostic classification and detection of cancer. **Mol Oncol**, Doi: 10.1002/1878-0261.12025., v. 11, n. 2, p. 220-234, fev. 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [S.L], v. 144, p. 646-674, mar. 2011.

HARADA, H. et al. Methylation of Breast Cancer Susceptibility Gene 1 (BRCA1) Predicts Recurrence in Patients With Curatively Resected Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer**, [S.L], v. 119, n. 4, jan. 2013.

HATA, Akiko; KASHIMA, Risa. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. **Crit Rev Biochem Mol Biol.**, [S.L], p. 1-14, dez. 2015.

Heneghan, H. M. et al. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. **The Oncologist** 15, 673–682. 2010.

HGMD. **The human gene mutation database**. Disponível em: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=brca1>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

HILAKIVI-CLARKE, L. et al. Pregnancy hormonal environment and mother's breast cancer risk. **Horm Mol Biol Clin Investig.**, [S.L], v. 9, n. 1, p. 11-23, abr. 2012.

HU, Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, DOI: 10.1186/1471-2164-7-96, v. 7, n. 96, p. 1-12, abr. 2006.

HUANG, Y. et al. Biological functions of microRNAs: a review. **J Physiol Biochem.**, [S.L], p. 129–139, out. 2010.

HUYNH, Felicia C.; JONES, Frank E.. MicroRNA-7 Inhibits Multiple Oncogenic Pathways to Suppress HER2D16 Mediated Breast Tumorigenesis and Reverse Trastuzumab Resistance. **PLOS ONE**, DOI:10.1371/journal.pone.0114419, p. 1-16, dez. 2014.

IARC. **International agency for research on cancer**. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2016.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/consensointegra.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2016.

INGVARSSON, Sigurdur. Breast cancer: introduction. **CANCER BIOLOGY**, Doi:10.1006/scbi.2001.0381, v. 11, p. 323–326, jan. 2001.

ISONO, M. et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. **Cell Reports**, Doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042, v. 18, n. 2, p. 520-532, jan. 2017.

IWAMOTO, T. et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. **Breast Cancer Res Treat**, Doi: 10.1007/s10549-010-1188-1, v. 129, n. 1, p. 69-77, ago. 2011.

JI, Weidan; SUN, Bin; SU, Changqing. Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. **Genes**, Doi:10.3390/genes8010021, p. 1-15, ./jan. 2017.

JR, H. A. A. et al. Elucidating Prognosis and Biology of Breast Cancer Arising in Young Women Using Gene Expression Profiling. **Clin Cancer Res.**, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2599, v. 18, n. 5, p. 1341-1351, jan. 2012.

KAMIŃSKA, M.; CISZEWSKI, T.; ŁOPACKA-SZATAN, K.; MIOTŁA, P.; STAROSŁAWSKA, E. Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny**, 14(3): 196-202. 2015.

KEFAS, B. et al. MicroRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is Down-regulated in Glioblastoma. **Cancer Research**, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6639, v. 68, n. 10, p. 3566-3572, mai. 2008.

KHELLA, H. W. Z. et al. MiR-10b is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. **J Clin Pathol**, [S.L], p. 1-6, mar. 2017. Disponível em: <doi: 10.1136/jclinpath-2017-204341.>. Acesso em: 01 abr. 2017.

KIMA, Young-Kook; KIMA, Boseon; KIM, V. Narry. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. **PNAS**, [S.L], v. 113, p. 1881-1889, mar. 2016. Disponível em: <doi: 10.1073/pnas.1602532113>. Acesso em: 02 jan. 2017.

KNIRSH, R. et al. MicroRNA 10b promotes abnormal expression of the protooncogene c-Jun in metastatic breast cancer cells. **Oncotarget**, [S.L], v. 7, n. 37, p. 59932-59944, ago. 2016.

KRAJC, M. et al. Five recurrent BRCA1/2 mutations are responsible for cancer predisposition in the majority of Slovenian breast cancer families. **BMC Med Genet.**, [S.L.], 10; 9:83, set. 2008.

LAX, S. F.. Hereditary breast and ovarian cancer. **Pathologe.**, Doi: 10.1007/s00292-017-0298-5, v. 38, n. 3, p. 149-155, mai. 2017.

LEE, R C; FEINBAUM, R L; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell.**, [S.L.], p. 843-54, dez. 1993.

LEEB, Kyung Min; CHOIB, Eun Jung; KIM, In Ah. MicroRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling. **Elsevier**, Doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.050, v. 101, n. 1, p. 171–176, fev. 2009.

LI, H. et al. BMI, reproductive factors, and breast cancer molecular subtypes: A case-control study and meta-analysis. **Journal of Epidemiology**, [S.L.], p. 1-9, mai. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.je.2016.05.002>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

LI, Mischa L.; GREENBERG, Roger A.. Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. **Trends Biochem Sci**, Doi:10.1016/j.tibs.2012.06.007., v. 37, n. 10, p. 418–424, out. 2012.

LIANG, S. et al. The experimental study of miRNA in pituitary adenomas. **Turk Neurosurg** 23, 721–727. 2013.

LIU, C. et al. Network Meta-Analysis on the Effects of DNA Damage Response-Related Gene Mutations on Overall Survival of Breast Cancer Based on TCGA Database. **J Cell Biochem.**, [S.L.], mai. 2017. Disponível em: <doi:10.1002/jcb.26140>. Acesso em: 31 mai. 2017.

LIU, X. et al. Identification of recurrent BRCA1 mutation and its clinical relevance in Chinese Triple-negative breast cancer cohort. **Cancer Medicine**, Doi: 10.1002/cam4.1004, p. 1-8, dez. 2016.

LOPES, C. M. et al. Clinical, histomorphological, and therapeutic prognostic factors in patients with triple-negative invasive breast cancer. **J Bras Patol Med Lab**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 397-406, dez. 2016.

LOURO, I. D. Oncogenética. **Rev Soc Bras Canc**, n. 11, p. 36-42, 2000.

LU, Y. C. et al. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. **Cancer Prev Res** 5, 665–674. 2012.

LU, Y.; Yao, J.; Yu, J.; Wei, Q.; Cao, X. The association between abnormal microRNA-10b expression and cancer risk: a meta-analysis. **SCIENTIFIC REPORTS**. November 2014.

MA, Li; TERUYA-FELDSTEIN, Julie; WEINBERG, Robert A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature** 2007 Oct.11; 449(7163):682-88. Epub 2007 Sept. 26. Erratum: Nature 2008 Sept 11;455(7210):256

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology & Therapy**, DOI: 10.4161/cbt.10.10.13879, v. 10, n. 10, p. 955-960, nov. 2010.

MANIE, E. et al. Genomic hallmarks of homologous recombination deficiency in invasive breast carcinomas. **International Journal of Cancer**, DOI: 10.1002/ijc.29829, v. 138, p. 891–900, ago. 2015.

MAO, O.; Yongxin, L.; Sheng, Y.; Jieyi, M.; Liming, L.; Weiming, L.; Guangqi, C.; Xiaoxi, L.; Qing, L.; Shenming, W.; Wenjian, W. MicroRNA Profiling Implies New Markers of Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer. **PLOS ONE**, v. 9(5), p.1-8. 2014.

MAREEL M, LEROY A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev**, 83:337-76. 2003.

MARTINS, E. et al. Prevalence of breast cancer in the city of Goiânia, Goiás, Brazil, between 1988 and 2002. **Sao Paulo Med. J**, Doi.org/10.1590/S1516-31802011000500005, v. 129, n. 5, p. 309-314, mai. 2011.

MASUDA, M. et al. An induction of microRNA, miR-7 through estrogen treatment in breast carcinoma. **Journal of Translational Medicine**, [S.L], v. 10, n. 1, p. 1-9, set. 2012.

MATAMALA, N. et al. MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression. **Oncotarget**, [S.L], v. 7, n. 15, fev. 2016.

MAVADDATA, N. et al. Genetic susceptibility to breast cancer. **Mol Oncol.**, [S.L], 4(3): 174-91, jun. 2010.

MAXWELL, Cathy. Biomarker research in breast cancer. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, DOI: 10.1188/10.CJON.771-783, v. 14, n. 6, p. 771-783, dez. 2010.

MCTIERNAN, Anne. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. **JAMA.**, [S.L], v. 290, n. 10, p. 1331-1336, set. 2003.

MEDIMEGH, I. et al. MicroRNAs Expression in Triple Negative vs Non Triple Negative Breast Cancer in Tunisia: Interaction with Clinical Outcome. **PLOS ONE**, [S.L], v. 9, nov. 2014.

MEISTER, Gunter. **RNA Biology: An introduction**. [S.L.]: Wiley-VCH, 2011. 245-269 p.

MERTZ, Tony M; HARCZY, Victoria; ROBERTS, Steven A. Risks at the DNA Replication Fork: Effects upon Carcinogenesis and Tumor Heterogeneity. **Genes**, Doi:10.3390/genes8010046, v. 8, n. 1, p. 1-21, jan. 2017.

M'HAMED, I. F. et al. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. **Cell Oncol**, DOI 10.1007/s13402-015-0239-3, v. 38, p. 433–442, set. 2015.

MICHAILIDOU, K. et al. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer. **Nat Genet.**, [S.L], p. 373–380, abr. 2015.

MIRBASE. **Mirbase: the microrna database.** Disponível em: <<http://www.mirbase.org>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica.** 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MORIARTY, C. H.; Pursell, B.; Mercurio, A. M. miR-10b targets Tiam1: implications for Rac activation and carcinoma migration. **The Journal of Biological Chemistry.** 2010.

NCBI. **National center for biotechnology information.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>>. Acesso em: 01 set. 2016.

NCBI. **National center for biotechnology information.** Gene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>>. Acesso em: 06 jan. 2017.

NETTER, Frank H.. **Atlas de anatomia humana.** 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 176-178 p.

NGOWA, J. D. K. et al. Breast Cancer Survival in Cameroon: Analysis of a Cohort of 404 Patients at the Yaoundé General Hospital. **Scientific Research Publishing**, v. 4, n. 2, p. 44-52, abr. 2015.

O'DAY, Elizabeth; LAL, Ashish. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. **Breast Cancer Research**, DOI: 10.1186/bcr2484, v. 12, p. 1-10, mar. 2010.

OHARA, M. et al. Prognostic value of Ki67 and p53 in patients with estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer: Validation of the cut-off value of the Ki67 labeling index as a predictive factor. **Mol Clin Oncol.**, [S.L], 4(4): 648-654, jan. 2016.

OKUDA, H. et al. MiR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. **Cancer Res**, Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2037, v. 73, n. 4, p. 1434–1444., fev. 2013.

ORDWAY, J. M. et al. Identification of novel high-frequency DNA methylation changes in breast cancer. **PLoS One**, [S.L], 19;2 (12) :e1314, dez. 2007.

PECK, J. D. et al. Steroid hormone levels during pregnancy and incidence of maternal breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, [S.L], v. 11, n. 4, p. 361-368, abr. 2002.

PENAULT-LLORCA, F.; VIALE, G.. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. **Annals of Oncology**, [S.L], p. 23(6) vi19-vi22, 2012.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **NATURE**, Doi:10.1038/35021093, v. 406, p. 747-752, ago. 2000.

PIAO, Hai-long; MA, Li. Non-coding RNAs as regulators of mammary development and breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, [S.L], 17(1):33-42, mar. 2012.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med.**, DOI: 10.1056/NEJMoa052306, v. 353, n. 16, p. 1659-1672, out. 2005.

QUANN, Kevin; JING, Yi; RIGOUTSOS, Isidore. Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. **Front Genet.**, Doi: 10.3389/fgene.2015.00242, v. 6, n. 242, p. 1-10, jul. 2015.

RADOJICIC, J. et al. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. **Cell Cycle**, DOI: 10.4161/ cc.10.3.14754, v. 10, n. 3, p. 507-517, fev. 2011.

RAYCHAUDHURI, M. et al. MicroRNAs miR-7 and miR-340 predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer**, Doi:10.1007/s10549-017-4132-9, fev. 2017.

REDDY, Kaladhar B. MicroRNA (miRNA) in cancer. **Cancer Cell International**, DOI: 10.1186/s12935-015-0185-1, v. 15, n. 38, p. 1-6, abr. 2015.

REDDY, S. D. N. et al. MicroRNA-7, a Homeobox D10 Target, Inhibits the p21-Aactivated Kinase 1 and Regulates its Functions. **Cancer Res**, Doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2103, v. 68, n. 20, p. 8195–8200, out. 2008.

REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52(1), p. 108-18. 2008.

ROCK, Cheryl L.; DEMARK-WAHNEFRIED, Wendy. Nutrition and Survival After the Diagnosis of Breast Cancer : A Review of the Evidence. **J Clin Oncol**, DOI: 10.1200/JCO.2002.03.008, v. 20, n. 15, p. 3302-3316, ago. 2002.

ROSNER, B. et al. Weight and weight changes in early adulthood and later breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, [S.L], p. 2-26, jan. 2017. Disponível em: <10.1002/ijc.30627>. Acesso em: 12 jan. 2017.

ROULOT, A. et al. Tumoral heterogeneity of breast cancer. **Ann Biol Clin**, [S.L], v. 74, n. 6, p. 653-660, dez. 2017.

RUDOLPH, Anja; CHANG-CLAUDE, Jenny; SCHMIDT, Marjanka K. Gene–environment interaction and risk of breast cancer. **British Journal of Cancer**, [S.L], p. 125–133, jan. 2016.

SANDHU, R. et al. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. **Lab Med**. 2010 Jan 6;41(6):364–72.

SASAYAMA, T. et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. **Int J Cancer** 125, 1407–1413. 2009.

SHARMA, G. et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. **Life Sci.**, Doi: 10.1016/j.lfs.2010.05.001., v. 87, n. 3, p. 83-91, jul. 2010.

SHARP, Phillip A.. The Centrality of RNA. **Cell.**, [S.L], 136(4): 577-580, fev. 2009.

SHI, T. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer patients from China: Ethnic-related mutations in BRCA1 associated with an increased risk of ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, [S.L], p. 1-22, fev. 2017. Disponível em: <doi: 10.1002/ijc.30633>. Acesso em: 01 fev. 2017.

SHI, Y. et al. MiR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGγ. **Cancer Letters**, [Http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.014](http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.014), v. 358, n. 1, p. 27–36, mar. 2015.

SHUKLA, S. et al. Evaluation of HER2/neu oncoprotein in serum & tissue samples of women with breast cancer. **Indian J Med Res**, [S.L], v. 143, p. 52–58, mai. 2016.

SOARES, L. R. et al. Mortalidade por câncer de mama feminino no Brasil de acordo com a cor. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, DOI: 10.1590/SO100-720320150005319, v. 37, n. 8, p. :388-392, jan./ago. 2015.

SOBIN, L H; GOSPODAROWICZ, M K; WITTEKIND, Ch. **TNM: Classificação de Tumores Malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg**. 7 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 187-199 p.

SOBIN, L H; WITTEKIND, Ch. **TNM: Classificação de Tumores Malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg**. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 187-199 p.

SOBOTTA, J. **Atlas de Anatomia Humana**. 21ed, Vol. II. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

STIVAL, R. A. et al. Impacto do fenótipo triplo-negativo no prognóstico de pacientes com câncer de mama de uma unidade de referência no Brasil central. **Rev Bras Mastologia**, [S.L], v. 22, n. 1, p. 6-12, nov. 2011.

SUN, Bryan K.; TSAO, Hensin. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol.**, Doi: 10.1016/j.jaad.2008.08.017, v. 59, n. 5, p. 725-737, nov. 2008.

TAN, X. et al. MiR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, [S.L], set. 2014.

TANAKA, Masatake; IWAKIRI, Yasuko. The Hepatic Lymphatic Vascular System: Structure, Function, Markers, and Lymphangiogenesis. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol.**, Doi:10.1016/j.jcmgh.2016.09.002, v. 2, n. 6, p. 733-749, nov. 2016.

TEPLYUK, N. M. et al. MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. **Neuro Oncol.** 14, 689–700. 2012.

TORRES-MARTIN, M. et al. Global profiling in vestibular schwannomas shows critical deregulation of microRNAs and upregulation in those included in chromosomal region 14q32. **PLoS One** 8, e65868. 2013.

VAZ, F. H. et al. Familial breast/ovarian cancer and BRCA1/2 genetic screening: the role of immunohistochemistry as an additional method in the selection of patients. **J Histochem Cytochem.**, DOI: 10.1369/jhc.7A7209.2007, v. 55, n. 11, p. 1105-1113, nov. 2007.

VIALE, G. et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. **J Clin Oncol.**, DOI: 10.1200/JCO.2007.11.9453, v. 25, n. 25, p. 3846-3852, ago. 2007.

VIJVER, M. J. V. D. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med.**, DOI: 10.1056/NEJMoa021967, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, dez. 2002.

VIMALRAJ, S.; SELVAMURUGAN, N.. MicroRNAs: Synthesis, Gene Regulation and Osteoblast Differentiation. **Curr Issues Mol Biol.**, [S.L], v. 15, p. 7-18, jan. 2013.

WALTER, B. A. et al. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. **J Cancer** 4, 350–357. 2013.

WANG, N. et al. Prognostic significance of microRNA-10b overexpression in breast cancer: a meta-analysis. **Genet Mol Res.**, Doi: 10.4238/gmr.15027350., v. 15, n. 2, p. gmr.15027350., abr. 2016.

WEBSTER, R. J. et al. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Human Cancer Cells by MicroRNA-7. **J Biol Chem**, Doi: 10.1074/jbc.M804280200, v. 284, n. 9, p. 5731-5741, fev. 2009.

WU, I. et al. Promoter methylation of BRCA1 in the prognosis of breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, Doi: 10.1007/s10549-013-2774-9, v. 142, n. 3, p. 619-627, dez. 2013.

WU, L. et al. Aberrant promoter methylation of cancer-related genes in human breast cancer. **ONCOLOGY LETTERS**, DOI: 10.3892/ol.2016.5351, v. 12, p. 5145-5155, out. 2016.

WU, X. et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. **J Transl Med.** 10, 42 . 2012.

WUA, X. et al. MicroRNA-424 inhibits cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition by downregulating doublecortin-like kinase 1 in ovarian clear cell carcinoma. **Int J Biochem Cell Biol.**, [S.L], fev. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272517300274>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

XIE, Z. et al. Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. **PLoS One**, DOI: 10.1371/journal.pone.0057502, v. 8, n. 4, jan. 2013.

YI, R., et al., Exportin-5mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v.17, n.24, Dec 15, p.3011-6. 2003.

YOO K., et al. Postmenopausal obesity as a breast cancer risk factor according to estrogen and progesterone receptor status (Japan). **Cancer Lett**, 167:57-63. 2001.

YUN, Ai-Ming; PAN, Yu-Zhuo. Noncoding microRNAs: small RNAs play a big role in regulation of ADME?. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L], p. 93-101, fev. 2012.

YUNG, Rachel L.; LIGIBEL, Jennifer A.. Obesity and Breast Cancer: Risk, Outcomes, and Future Considerations. **Clinical Advances in Hematology**, [S.L], v. 14, n. 10, p. 790-797, out. 2016.

ZAVALA, V. et al. MiR-146a and miR-638 in BRCA1-deficient triple negative breast cancer tumors, as potential biomarkers for improved overall survival. **Cancer Biomark**, [S.L], v. 16, n. 1, p. 99-107, 2016.

ZHOU, Yingchun; ZHAO, Hongyang; PENG, Cheng. Association of sedentary behavior with the risk of breast cancer in women: update meta-analysis of observational studies. **Annals of Epidemiology**, [Http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2015.05.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2015.05.007), v. 25, n. 9, p. 687–697, set. 2015.

ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO TNM CLÍNICO

TNM - Classificação Clínica	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> :
	Tis (CDIS) Carcinoma ductal <i>in situ</i> /carcinoma intraductal.
	Tis (CLIS) Carcinoma lobular <i>in situ</i> /carcinoma intralobular.
	Tis (Paget) Doença de Paget do mamilo não associada a carcinoma <i>in situ</i> (CDIS e/ou CLIS) no parênquima mamário subjacente. Os carcinomas no parênquima mamário associados à doença de Paget são classificados de acordo com tamanho e características da neoplasia parenquimatosa, porém, a presença da doença de Paget deve ser registrada.
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão.
	T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão.
	T1a Tumor com mais de 0,1 cm e com até 0,5 cm em sua maior dimensão.
	T1b tumor com mais de 0,5 cm e com até 1 cm em sua maior dimensão.
	T1c Tumor com mais de 1 cm e com até 2 cm em sua maior dimensão.
T2	Tumor com mais de 2 cm e com até 5 cm em sua maior dimensão.
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão.
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica e/ou à pele (ulceração ou nódulos satélites)
	T4a Extensão à parede torácica (não inclui invasão de músculo peitoral apenas.
	T4b Ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama, ou edema cutâneo (inclusive "pele de laranja [peau d'orange]")
	T4c Ambos T4a e T4b, acima.
	T4d Carcinoma inflamatório.

Continua...

...Continuação.

TNM - Classificação Clínica	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por exemplo, por terem sido removidos previamente).
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral (ais), nível(is) I, II, móvel (eis).
N2	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) nível(is) I, II, clinicamente fixo(s) ou confluyente (s); ou metástase detectada clinicamente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es).
N2a	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) fixos uns aos outros ou a outras
N2b	Metástase detectada clinicamente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)
N3	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) (nível III) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) nível (is) I, II; ou metástase detectada clinicamente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es) nível (is) I, II; ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s).
N3a	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es).
N3b	Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilar(es).
N3c	Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)
TNM - Classificação Clínica	
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

(Adaptado de: Classificação de Tumores Malignos (Brasil)/UICC).

ANEXO B – CLASSIFICAÇÃO TNM PATOLÓGICO

TNM - Classificação Patológica	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> :
	Tis (CDIS) Carcinoma ductal <i>in situ</i> /carcinoma intraductal.
	Tis (CLIS) Carcinoma lobular <i>in situ</i> /carcinoma intralobular.
	Tis (Paget) Doença de Paget do mamilo não associada a carcinoma <i>in situ</i> (CDIS e/ou CLIS) no parênquima mamário subjacente. Os carcinomas no parênquima mamário associados à doença de Paget são classificados de acordo com tamanho e características da neoplasia parenquimatosa, porém, a presença da doença de Paget deve ser registrada.
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão.
	T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão.
	T1a Tumor com mais de 0,1 cm e com até 0,5 cm em sua maior dimensão.
	T1b tumor com mais de 0,5 cm e com até 1 cm em sua maior dimensão.
	T1c Tumor com mais de 1 cm e com até 2 cm em sua maior dimensão.
T2	Tumor com mais de 2 cm e com até 5 cm em sua maior dimensão.
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão.
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica e/ou à pele (ulceração ou nódulos satélites)
	T4a Extensão à parede torácica (não inclui invasão de músculo peitoral apenas.
	T4b Ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama, ou edema cutâneo (inclusive "pele de laranja [peau d'orange]")
	T4c Ambos T4a e T4b, acima.
	T4d Carcinoma inflamatório.

Continua...

...Continuação

TNM - Classificação Patológica	
pNX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por exemplo, removidos previamente)
pN0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
pN1	Micrometástase; ou metástase em um a três linfonodo(s) axilare(es) homolateral(is); e/ou com linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) com metástase detectada por biópsia de linfonodo sentinela, porém não detectada clinicamente.
pN1mi	Micrometástase (maior que 0,2 mm e/ou mais que 200 células, porém não maior que 2 mm em sua maior dimensão).
pN1a	Metástase em um a três linfonodo(s) axilar(es) incluindo, pelo menos, um maior que 2 mm em sua maior dimensão.
pN1b	Linfonodo(s) mamário(s) interno(s) com metástase micro ou macroscópica detectada por biópsia de linfonodo sentinela, porém não detectada clinicamente.
pN1c	Metástase em um a três linfonodos axilares e linfonodos mamários internos com metástase micro ou macroscópica, detectada por biópsia de linfonodo sentinela, porém não detectada clinicamente.
pN2	Metástase em quatro a nove linfonodos axilares homolaterais, ou em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), detectada clinicamente, ^T há <i>ausência</i> de metástase em linfonodos axilares.
pN2a	Metástase em quatro a nove linfonodos axilares incluindo pelo menos uma maior que 2 mm.
pN2b	Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), detectada clinicamente, na <i>ausência</i> de metástase em linfonodos axilares.
pN3	Metástase como descrita abaixo:
pN3a	Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos uma maior que 2 mm) ou metástase em linfonodos infraclaviculares.
pN3b	Metástase detectada clinicamente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de linfonodos axilares positivos; ou metástase em mais de três linfonodos axilares e em linfonodos mamários internos com metástase micro ou macroscópica detectada por biópsia de linfonodo sentinela, porém não detectada clinicamente.
pN3c	Metástase em linfonodos supraclaviculares homolaterais.
TNM - Classificação Patológica	
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase a distância confirmada microscopicamente.

(Adaptado de: Classificação de Tumores Malignos (Brasil)/UICC).

**ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO ÉTICO DA
INSTITUIÇÃO PROPONENTE**

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MICRO-RNAs POTENCIALMENTE ASSOCIADOS À REGULAÇÃO DE BRCA1 EM CARCINOMAS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS

Pesquisador: VERA APARECIDA SADDI

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

Versão: 1

CAAE: 40018514.4.0000.0031

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CANCER EM GOIAS

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 948.930

Data da Relatoria: 04/02/2015

Apresentação do Projeto:

No presente trabalho, propõe-se o estudo de miRNAs potencialmente associados à regulação da expressão de BRCA1. Os miRNAs a serem estudados foram selecionados a partir de recursos de bioinformática e serão investigados em carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos e associados tanto à expressão de BRCA1, como aos aspectos clínicos, histopatológicos e prognósticos desses tumores. O estudo proposto é retrospectivo, transversal e analítico e visa avaliar a expressão de miRNAs potencialmente reguladores da expressão do gene BRCA1, em carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos. O estudo deverá analisar amostras de carcinomas mamários fixadas em formol e incluídas em parafina. A expressão de miRNAs será feita por PCR em tempo real e a detecção da proteína BRCA1 por imuno-histoquímica. O estudo visa ainda avaliar as potenciais associações entre os perfis de expressão obtidos para esses marcadores e os aspectos clínicos e prognósticos observados nos dois grupos carcinomas. O grupo a ser analisado deverá incluir 100 casos de carcinomas mamários, sendo 50 triplo-negativos e 50 não triplo-negativos. Os blocos contendo os espécimes tumorais serão selecionados a partir dos arquivos do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. Os dados clínicos e histopatológicos serão colhidos dos respectivos prontuários, incluindo a idade da

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 948.930

paciente, tipo histopatológico do tumor, grau histológico, tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos regionais, presença de metástase à distância, resultados da análise imuno-histoquímica de HER2, receptores de estrógenos e receptores de progesterona e status da paciente na última consulta.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a expressão de miRNAs potencialmente associados à regulação do gene BRCA1 em amostras de carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos.
- Determinar o perfil de expressão dos miRNAs hsa-miR-7, hsa-miR-10b, hsa-miR-205ab, hsa-miR-212-3p e hsa-miR-218a em amostras de carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos.
- Avaliar a expressão da proteína BRCA1, nos tumores selecionados;
- Investigar as possíveis associações entre a expressão de BRCA1 e os miRNAs avaliados, nos dois grupos de pacientes;
- Investigar as possíveis associações entre a expressão de BRCA1, os miRNAs avaliados e os aspectos clínicos e prognósticos observados nos dois grupos de pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estudo epidemiológico molecular, transversal e analítico, retrospectivo, tipo caso-controle, com a utilização dos dados clínicos e histopatológicos colhidos a partir de prontuários de pacientes com carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos e determinação da expressão de miRNAs e BRCA1 em amostras de biópsia ou peça cirúrgica, fixadas em formol e incluídas em parafina, obtidas dos dois grupos de pacientes. Para determinação dos perfis de expressão dos miRNAs de pacientes com câncer de mama, serão utilizadas amostras de biópsias parafinadas provenientes do Arquivo de Blocos do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, da Associação de Combate ao Câncer de Goiás – ACCG. Um total de 100 amostras será selecionado, sendo 50 carcinomas de mama que apresentam o fenótipo “triplo-negativo” - Receptores de Progesterona (RP), Receptores de Estrógeno (RE) e de Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano tipo 2 (HER-2) negativos – e as outras 50 amostras provenientes de carcinomas de mama não triplo-negativos. As amostras selecionadas serão provenientes de biópsia ou peça cirúrgica, porém, sem nenhum tratamento neoadjuvante e devem apresentar pelo menos cinco anos de seguimento. Todas as 100 amostras também serão avaliadas quanto à expressão do gene BRCA1. Os resultados esperados visam a melhor compreensão de mecanismos moleculares associados ao comportamento mais agressivo dos carcinomas triplo-negativos, bem como a identificação de alvos moleculares específicos (miRNAs), passíveis de serem usados em estudos clínicos

Endereço: 239
 Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 948.930

posteriores.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

5.6.1 - Critério de Inclusão: Grupo de Casos: Pacientes com carcinomas de mama, com fenótipo triplo-negativos, que apresentam blocos de parafina disponíveis e suficientes para análises moleculares, dados clínicos e histopatológicos disponíveis nos respectivos prontuários e seguimento clínico mínimo por um período de cinco anos. Grupo de controles: Pacientes com carcinomas de mama, com fenótipo não triplo-negativos, que apresentam blocos de parafina disponíveis e suficientes para análises moleculares, dados clínicos e histopatológicos disponíveis nos respectivos prontuários e seguimento clínico mínimo por um período de cinco anos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentadas e estão de acordo

Recomendações:

apresenta programa aprovado pela FAPEG Nº 04/2014 contemplado com verba de R\$ 64.982,00 que contemplara os custos da mesma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

havera necessidade de formação banco mas a pesquisadora relata conhecer a resolução 441/11 e apos a pesquisa as amostras serão destruidas e não serão realizadas novas pesquisas. solicita dispensa do TCLE pois trata-se de material do serviço de anatomia patologica e revisão de prontuarios

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer aprovado

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 948.930

GOIANIA, 09 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Elismauro Francisco de Mendonça
(Coordenador)

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

**ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO ÉTICO DA
INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MICRO-RNAs POTENCIALMENTE ASSOCIADOS À REGULAÇÃO DE BRCA1 EM CARCINOMAS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS

Pesquisador: VERA APARECIDA SADDI

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 40018514.4.3001.0037

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CANCER EM GOIAS

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 962.767

Data da Relatoria: 25/02/2015

Apresentação do Projeto:

O estudo proposto é retrospectivo, transversal e analítico e visa avaliar a expressão de miRNAs potencialmente reguladores da expressão do gene BRCA1, em carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos. O estudo deverá analisar amostras de carcinomas mamários fixadas em formol e incluídas em parafina. A expressão de miRNAs será feita por PCR em tempo real e a detecção da proteína BRCA1 por imuno-histoquímica. O estudo visa ainda avaliar as potenciais associações entre os perfis de expressão obtidos para esses marcadores e os aspectos clínicos e prognósticos observados nos dois grupos carcinomas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a expressão de miRNAs potencialmente associados à regulação do gene BRCA1 em amostras de carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos.

Objetivo Secundário:

- Determinar o perfil de expressão dos miRNAs hsa-miR-7, hsa-miR-10b, hsa-miR-205ab, hsa-miR-212-3p e hsa-miR-218a em amostras de carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069

Bairro: Setor Universitário

CEP: 74.605-010

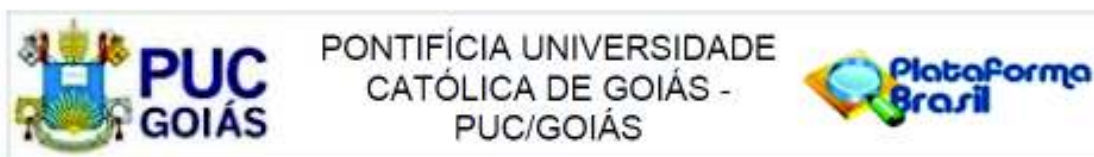
UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3946-1512

Fax: (62)3946-1070

E-mail: cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 962.767

negativos, provenientes de pacientes atendidas no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer de Goiás – ACCG;- Avaliar a expressão da proteína BRCA1, nos tumores selecionados;- Investigar as possíveis associações

entre a expressão de BRCA1 e os miRNAs avaliados, nos dois grupos de pacientes;- Investigar as possíveis associações entre a expressão de BRCA1, os miRNAs avaliados e os aspectos clínicos e prognósticos observados nos dois grupos de pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentados dentro do previsto na Resolução 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante e já se encontra aprovado na instituição proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos dentro do previsto na Resolução 466/12.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

GOIANIA, 25 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
NELSON JORGE DA SILVA JR.
 (Coordenador)

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.089
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 74.605-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3946-1512 **Fax:** (62)3946-1070 **E-mail:** cep@pucgoias.edu.br

ANEXO E - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE MICRORNAS

EXTRAÇÃO DE MICRORNAS UTILIZANDO > 2 FILETES DE AMOSTRA

miRNeasy FFPE Kit

1. Cortar os filetes da amostra. Utilizar lâmina e bisturi.
2. Cada filete deve ser cortado em pequenos pedaços.
3. Transferir os filetes cortados para um microtubo de 2mL.
4. Desparafinização da amostra.
 - 4.1. Adicionar 500 μ L de Xileno.
 - 4.2. Incubar por 15' a 60°C.
 - 4.3. Centrifugar por 5' a 13.000 rpm.
 - 4.4. Descartar o Xileno. Utilizar a pipeta, tomando cuidado com o pellet do fundo.
 - 4.5. Repetir os passos 4.1. ao 4.4.
 - 4.6. Adicionar 500 μ L de etanol 100%.
 - 4.7. Incubar 15' a 60°C.
 - 4.8. Centrifugar por 5' a 13.000 rpm.
 - 4.9. Descartar o etanol. Utilizar a pipeta, tomando cuidado com o pellet do fundo.
 - 4.10. Repetir os passos 4.6 ao 4.9.
 - 4.11. Deixar a amostra secar a TA por 15'.
5. Deixar a amostra retornar a TA.
6. Adicionar 240 μ L de **Buffer PKD**.
 - 6.1. Agitar em vórtex.
7. Centrifugar por 1' a 10.000 rpm.
8. Adicionar 10 μ L de **Proteinase K**.
 - 8.1. Homogeneizar suavemente (pipetando).
9. Incubar a 56°C por 15'. (Agitar em vórtex a cada 5').
 - 9.1. Incubar a 80°C por 15'. (Agitar em vórtex a cada 5').
10. Transferir a fase transparente (fundo) para um novo microtubo.
11. Incubar em gelo por 3'.
 - 11.1. Centrifugar por 15' a 13.500 rpm.
12. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo.
13. Adicionar 25 μ L de **DNase Booster Buffer**.

- 13.1. Adicionar 10 μ L de **DNase I**.
- 13.2. Homogeneizar por inversão do tubo.
- 13.3. Spin na centrifuga.
14. Incubar a TA por 15'.
15. Adicionar 400 μ L de **Buffer RBC**.
 - 15.1. Homogeneizar o lisado.
16. Adicionar 1400 μ L de Etanol 100%.
 - 16.1. Homogeneizar (pipetando).
 - 16.2. Obs.: NÃO CENTRIFUGAR.
 - 16.3. Passo 17 imediatamente.
17. Transferir 700 μ L (Incluindo o precipitado) para a **coluna de RNeasy® MinElute®** com tubo coletor acoplado.
 - 17.1. Centrifugar por 15" a ≥ 10.000 rpm.
 - 17.2. Descartar o filtrado.

REUTILIZAR O TUBO COLETOR NO PASSO 18.
18. Repetir o passo 17.

REUTILIZAR O TUBO COLETOR NO PASSO 19.
19. Adicionar 500 μ L de **Buffer RPE** à coluna.
 - 19.1. Centrifugar por 15" a 10.000 rpm.
 - 19.2. Descartar o filtrado.

REUTILIZAR O TUBO COLETOR NO PASSO 20.
20. Adicionar 500 μ L de **Buffer RPE** à coluna.
 - 20.1. Centrifugar por 2' a 10.000 rpm.
 - 20.2. Descartar tubo coletor e filtrado.
21. Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2mL.
 - 21.1. Abrir a tampa da coluna.
 - 21.2. Centrifugar a velocidade máxima por 5'. *Garantir que a tampa esteja aberta.*
 - 21.3. Descartar tubo coletor e filtrado.
22. Colocar a coluna em novo tubo coletor de 1.5mL.
 - 22.1. Adicionar 30 μ L de **RNase-free water** à membrana da coluna.
 - 22.2. Fechar a tampa da coluna.
 - 22.3. Centrifugar por 1' à velocidade máxima para eluir o RNA.
23. Realizar leitura da concentração em *NanoDrop*.

ANEXO F - PROTOCOLO TRANSCRIÇÃO REVERSA

UTILIZAR MICRORNA EXTRAÍDO

miScript® II RT Kit

Modelo utilizado para realização da transcrição reversa (reagentes e volumes):

Componente	Volume/reação
<i>5x miScript HiSpec Buffer</i>	4 µL
<i>10x miScript Nucleics Mix</i>	2 µL
<i>RNase-free water</i>	Variável
<i>miScript Reverse Transcriptase Mix</i>	2 µL
<i>Template RNA</i>	Variável
Volume total	20 µL

- Preparar mix referente a quantidade de reações a serem realizadas. Não adicionar o *template* (microRNA total) ao mix;
- Adicionar o *template* (microRNA total);
- Incubar por 60' a 37°C;
- Incubar por 5' a 95°C para inativação da miScript Reverse Transcriptase Mix;
- Quantificar (*NanoDrop*)
- Armazenar em freezer a -20°C.

* A manipulação das reações e dos reagentes deve ocorrer a todo o momento em gelo.

ANEXO G – PCR EM TEMPO REAL

miScript SYBR® Green PCR kit

miScript Primer Assays (miRNA-7, miRNA-10b, miRNA-RNU-6)

As amostras geradas a partir da transcrição reversa devem ser diluídas previamente para utilização nas reações a seguir. A diluição deve permitir que todas as amostras sejam ajustadas para uma única concentração.

Relação de reagentes utilizados para Mix:

Componente	Volume/reação
<i>2x QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix</i>	12.5 µL
<i>10x miScript Universal Primer</i>	2.5 µL
<i>10x miScript Primer Assay</i>	2.5 µL
<i>RNase-free water</i>	Variável
<i>Template cDNA</i>	2.5 µL
Volume total	25 µL

- Dispensar cDNA individualmente nos poços da placa de PCR *Well*;
- Dispensar o volume apropriado do Mix individualmente nos poços da placa de PCR;
- Centrifugar por 1' em temperatura ambiente;
- Iniciar o programa de ciclagem no equipamento *StepOne* – *AppliedBiosystems* de acordo com a tabela abaixo:

Passo	Tempo	Temperatura	Comentários
Ativação inicial	15'	95°C	Ativação da DNA polimerase
3 passos de ciclagem (1 ciclo) – 45 ciclos			
Desnaturação	15"	94°C	
Anelamento	30"	55°C	
Extensão	30"	70°C	Coleta de dados fluorescente

APÊNDICE A – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS HOSPITAL ARAÚJO JORGE – SETOR DE ANATOMIA PATOLÓGICA

Prontuário: _____ Data do diagnóstico: ____/____/____

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Endereço: _____

Telefones: _____ Profissão: _____

Estado civil: (1) solteira (2) casada (3) viúva (4) outro (5) Não informado

História familiar de câncer de mama: (1) Sim _____ (2) Não

ANTECEDENTES PESSOAIS:

Idade ao diagnóstico: _____ anos () Desconhecida

Tabagismo: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Antecedentes de doença de mama: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Antecedentes de outras neoplasias: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Status menstrual:

(1) Pré-menarca (2) Menarca (3) Menacme (4) Menopausa (5) Não Informado

Paridade: G_____ P: _____ A_____ () Não informado

Amamentação: (1) Sim, Quanto tempo? _____ (2) Não (3) Não informado

Uso de ACHO: (1) Sim, Quanto tempo? _____ (2) Não (3) Não informado

PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

Amostra cirúrgica? (1) Sim, Nº AP: _____ (2) Não (3) Não informado

Biópsia “Core”? (1) Sim, Nº AP: _____ (2) Não (3) Não informado

Se SIM para biópsia, completar abaixo:

Receptor de estrógeno: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Receptor de Progesterona: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Her2: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Antígeno KI-67: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Se SIM para amostra cirúrgica, completar abaixo:

Receptor de estrógeno: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Receptor de Progesterona: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Her2: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

Antígeno KI-67: (1) Positivo _____% (2) Negativo (3) Não informado

FICHA ANATOMOPATOLÓGICA

Tipo de amostra:

(1) Biópsia

(2) Peça Cirúrgica (em caso de tratamento neoadjuvante negativo)

Número do AP: _____

Tipo Histológico:

(1) Carcinoma Ductal Invasivo (2) Carcinoma Lobular Invasivo

(3) Carcinoma Misto (Ductal + Lobular) (4) Outro _____

Tamanho do tumor em seu eixo maior: _____mm

Definido por: (1) Macro (2) Histo (3) Clínica/Imagem (4) Não informado

Localização do tumor:

Lateralidade: (1) Mama direita (2) Mama esquerda

Quadrantes: (1) Superolateral (QSL) (2) Superomedial (QSM)

(3) Inferolateral (QIL) (4) Inferomedial(QIM)

(5) Retromamilar (6) Não informado

Acometimento papilar (mamilo): (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Margem de ressecção:

(1) Livre, Distância da margem mais próxima do tumor: _____mm

(2) Acometida

Grau Histológico (SBR modificada por Elston & Ellis):

Formação de túbulos: _____

Índice mitótico: (Número de mitoses/10 campos 400x: _____)

Pleomorfismo celular: _____

Escore total:

Grau Histológico: (1) Grau I (2) Grau II (3) Grau III

Necrose no componente infiltrativo: (1) Presente _____% (2) Não observada

Invasão Vascular Linfática: (1) Presente (2) Não observada

Resposta inflamatória peritumoral:

(1) Leve (2) Moderada (3) Acentuada (4) Não observada

Carcinoma ductal *in situ* coexistente: (1) Presente (2) Não observado

Se presente, definir:

Extensão (somando as diversas áreas): _____ mm.

Grau nuclear: (1) Grau 1 (2) Grau 2 (3) Grau 3

Comedonecrose: (1) Presente (2) Ausente

Linfonodos Sentinelas:

(1) Identificados (2) Não identificados (3) Pesquisa não realizada

Se identificados: Quantos: _____ (1) Livres (2) Acometidos

Demais linfonodos:

(1) Identificados (2) Não identificados (3) Pesquisa não realizada

Localização/cadeia: _____

Número de linfonodos acometidos: _____

HISTÓRIA DE METÁSTASE

Metástase em Linfonodo (ao diagnóstico): (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Metástase à distância (ao diagnóstico): (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Se SIM, especificar:

(1) Cérebro (2) Fígado (3) Linfonodo (4) Medula Óssea

(5) Osso (6) Pele (7) Pleura (8) Pulmão

(9) Suprarrenal (10) Desconhecido (11) Outro _____

Metástase durante ou após tratamento (recidiva): (1) Sim (2) Não (3) NI

Se SIM, especificar:

(1) Cérebro (2) Fígado (3) Linfonodo (4) Medula Óssea

(5) Osso (6) Pele (7) Pleura (8) Pulmão

(9) Suprarrenal (10) Desconhecido (11) Outro _____

Estadiamento TNM (Estadiar com base nos dados anteriores): T ____ N ____ M ____

TRATAMENTO

Estadiamento clínico (se obtido no prontuário): _____

Tratamento cirúrgico: (1) Sim, Qual? _____ (2) Não (3) NI

Tratamento neoadjuvante: (1) Sim, Qual? _____ (2) Não (3) NI

Tratamento adjuvante:

Quimioterápico: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Radioterápico: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Hormonoterapia: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

EVOLUÇÃO

(1) Viva, último seguimento: ____/____/____.

(2) Óbito, em ____/____/____ Causa: (1) Ca de mama

(2) Outro: _____

(3) Perda de seguimento em: ____/____/____.

Coletado por: _____, em ____/____/____