



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Beatriz Camargo Lopes

MiR-210 e miR-152 e suas proteínas-alvo como biomarcadores
por biópsia líquida em câncer de mama

São José do Rio Preto
2019

Beatriz Camargo Lopes

MiR-210 e miR-152 e suas proteínas-alvo como biomarcadores
por biópsia líquida em câncer de mama

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP/Proc. nº 2017/11807-3
CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto
2019

L864m

Lopes, Beatriz Camargo

MiR-210 e miR-152 e suas proteínas-alvo como biomarcadores por biópsia líquida em câncer de mama / Beatriz Camargo Lopes. – São José do Rio Preto, 2019

131 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. Genética Humana. 2. Mamas Câncer. 3. microRNAs. 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. 5. Imunohistoquímica. I. Título.

Beatriz Camargo Lopes

MiR-210 e miR-152 e suas proteínas-alvo como biomarcadores
por biópsia líquida em câncer de mama

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP/Proc. nº 2017/11807-3
CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP
Orientadora

Prof. Dr. Ângelo Gustavo Zucca Matthes
Hospital do Amor – Barretos/SP

Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
UNESP – Campus de São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto
25 de fevereiro de 2019

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), do Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) de São José do Rio Preto – São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, com o apoio financeiro em forma de bolsa de estudos fornecida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (Proc. nº 2017/11807-3) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Com amor, dedico este trabalho a todas as pacientes deste estudo que enfrentam ou enfrentaram a árdua batalha contra o câncer de mama. Em especial à minha querida amiga Roseli Aparecida Matheus Pereira (in memoriam). Sem vocês este trabalho não seria possível. A força de todas foi um grande aprendizado para a minha vida.”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, pelo acolhimento, conhecimentos compartilhados e oportunidade de crescer em minha vida acadêmica. Sua dedicação e paciência permitiram que eu realizasse mais esta importante etapa da minha vida, desenvolvendo o pensamento crítico e a visão científica. Muito obrigada!

Ao médico, Dr. Newton Antonio Bordin Junior, chefe do Serviço de Mastologia do Hospital de Base, que apoiou este projeto, me auxiliando sempre que necessário. Muito obrigada!

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências do IBILCE/UNESP, Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, por todo apoio, possibilitando a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências – IBILCE / UNESP, bem como a todos os professores, alunos e funcionários, os quais contribuíram de maneira importante para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado concedida no período 04/2017 a 10/2017, que me acompanhou no início do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos que me acompanhou durante o mestrado no período 11/2017 a 02/2019 (Proc. n° 2017/11807-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP) pelo apoio financeiro concedido.

À toda a equipe de profissionais (médicos, enfermeiros e demais funcionários) do Instituto do Câncer (ICA) e do Serviço de Mamografia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pelas amostras de sangue e de biópsias.

À instituição IBILCE, pelo grande aprendizado adquirido durante a minha formação.

À instituição FAMERP, pelo espaço físico, estrutura e todo apoio que proporciona o desenvolvimento de nossas pesquisas.

À banca examinadora, Prof. Dr. Gustavo Zucca Matthes e Profa. Dra. Ana Elizabete Silva por gentilmente aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.

À banca examinadora do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Joice Matos Biselli e Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior, pelas valiosas sugestões que foram importantes para a minha dissertação.

As minhas grandes amigas do Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC): Jessica Oliveira e Jessica Zani. Obrigada por terem sido tão importantes nessa fase da minha vida.

Aos demais colegas do LIMC: Camila, Fabrício, Francine, Jéssica Mora, Jucimara, Lívia, Marina, Nathália, Paulo, Rodolfo, Roseli e Rubens, pela convivência e apoio de toda natureza que permitiram o desenvolvimento

deste projeto. Sem vocês os desafios desse trabalho seriam muito mais difíceis de resolver. Muito obrigada!

Aos meus pais, Rosair e José Antônio, por sempre me apoiarem em todas as decisões, e por toda abdicação que tiveram para me proporcionar uma boa educação. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Luiza e Gabriel, pelos momentos de distração e pelo apoio vindo de todas as formas possíveis. Espero ser um exemplo na vida de vocês. Amo muito vocês. Muito obrigada!

Ao Vinícius Buchi, por sempre estar ao meu lado, pelo carinho, compreensão, ajuda e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos meus avós, Marina, Eine (in memoriam) e José Almeida (in memoriam) pelo grande incentivo e grandes torcedores do meu sucesso. Muito obrigada!

A minha tia de consideração, Suerli, que sempre cuidou e torceu muito por mim. Muito obrigada!

Aos meus amigos: Ana Luísa, Ananda, Andréia, Fernanda, Gabriela, Guilherme, Juliana, Lucas, Maxwell, Natália Troiano, Tatiane e Rafaela. Sem o apoio de vocês, nada disso seria possível. Amo vocês e espero tê-los sempre na minha vida!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse momento.

*“ FELIZ AQUELE QUE TRANSFERE O QUE SABE E
APRENDE O QUE ENSINA. ” (CORA CORALINA)*

RESUMO

INTRODUÇÃO: A alta mortalidade do câncer de mama (CM) está relacionada com a ocorrência de metástase, processo que depende da angiogênese. A detecção de microRNAs circulantes por biópsia líquida, com destaque para o miR-210 e miR-152 no CM, é de grande importância para a determinação do diagnóstico precoce e prognóstico e, assim, podem contribuir para diminuir a mortalidade por CM. **OBJETIVO:** Identificar e validar microRNAs como biomarcadores circulantes não invasivos no diagnóstico e prognóstico de pacientes com CM e confirmar a atuação deles na angiogênese. **MATERIAL E MÉTODOS:** Amostras de fragmentos tumorais e de plasma foram coletados de 30 mulheres com CM, cinco com alterações benignas da mama e cinco de mulheres controles. A análise da expressão dos microRNAs foi realizada por RT-qPCR e a análise da expressão das proteínas-alvo por imunohistoquímica. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. **RESULTADOS:** Como esperado, houve aumento da expressão do oncomiR-210 e diminuição do supressor miR-152 nos fragmentos tumorais de CM. Já nas amostras de plasma de CM, foi verificado aumento de ambos os miRNAs. Por fim, constatou-se que as proteínas HIF-1 α , IGF-1R e VEGF apresentaram aumento da expressão em CM, enquanto a proteína VHL apresentou diminuição. **CONCLUSÃO:** Em conclusão, foi observado aumento de expressão do miR-210 e diminuição do supressor tumoral miR-152 em fragmentos de CM validadas pela expressão de suas proteínas-alvo envolvidas na angiogênese. Ainda, o aumento da expressão de ambos miRNAs por biópsia líquida de mulheres com CM é promissor no diagnóstico e prognóstico dessa neoplasia, e os torna potenciais biomarcadores, além do benefício de serem detectados por uma ferramenta minimamente invasiva.

Palavras-chaves: câncer de mama; microRNAs; angiogênese; biomarcadores.

ABSTRACT

BACKGROUND: The high mortality of breast cancer (BC) is related to the occurrence of metastasis, a process that depends on angiogenesis. The detection of circulating microRNAs by liquid biopsy, as a highlight for miR-210 and miR-152 in BC, is of great importance for the determination of early diagnosis and prognosis and, thus, may contribute to decrease BC mortality. **OBJECTIVE:** To identify and validate microRNAs as noninvasive circulating biomarkers in the diagnosis and prognosis of BC patients and to confirm their performance in angiogenesis. **MATERIALS AND METHODS:** Tumor fragments and plasma samples were collected from 30 women with BC, five with benign breast conditions and five of women controls. Expression of the microRNAs was performed by RT-qPCR and the analysis of target protein expression by immunohistochemistry. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **RESULTS:** As expected, there was an increase in oncomiR-210 expression and a decrease in miR-152 suppressor in BC tumor fragments. In the BC plasma samples, both miRNAs were increased. Finally, it was found that the HIF-1 α , IGF-1R and VEGF proteins showed increased BC expression, whereas the VHL protein showed decrease. **CONCLUSION:** In conclusion, increase expression of miR-210 and decrease of miR-152 tumor suppressor in BC fragments was observed, validated by the expression of their target proteins involved in angiogenesis. Furthermore, the increased expression of both miRNAs by liquid biopsy of women with BC is promising in the diagnosis and prognosis of this neoplasm, making them potential biomarkers, in addition to the benefit of being detected by a minimally invasive tool.

Keywords: breast cancer; microRNAs; angiogenesis; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativa de taxas padronizadas por idade (Mundial) de casos incidentes de câncer de mama em todo mundo em 2012.....	20
Figura 2. Distribuição das estimativas de (A) novos casos de câncer de mama e (B) de mortes por câncer de mama por região mundial.	20
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018 no Brasil, exceto pele não melanoma*.	22
Figura 4. Etapas da angiogênese.	39
Figura 5. Ativação do HIF-1 α	41
Figura 6. Via de sinalização do IGF-1R.....	42
Figura 7. Ação do VEGF.	44
Figura 8. Biópsia Líquida.....	47
Figura 9. Mecanismo tradicional já descrito de ação do miRNAs.	48
Figura 10. Biogênese dos miRNAs.	50
Figura 11. Ação dos miRNAs na tumorigênese.	52
Figura 12. Hallmarks do câncer: nova geração.....	53
Figura 13. miRNAs identificados no câncer de mama.....	54
Figura 14. miR-210 (A) e miR-152 (B) atuando no processo da angiogênese.	60

Quadro 1. Subtipos moleculares do câncer de mama.....	26
Quadro 2. Estadiamento do TNM câncer de mama por agrupamentos. .	27
Quadro 3. Interpretação das siglas da classificação TNM	28
Quadro 4. Categoria BI-RADS™ e seus respectivos significados clínicos	31

ARTIGO

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Evaluation of miRNA expression in fragments as diagnostic biomarkers	92
Figure 2. Evaluation of plasma miRNA expression as diagnostic biomarkers..	93
Figure 3. Evaluation of miRNA expression in fragments as prognostic biomarkers	94
Figure 4. Evaluation of plasma miRNA expression as prognostic biomarkers.	95
Figure 5. Target Proteins expression by immunohistochemistry.	96

LISTA DE TABELAS

Table 1. Demographic characteristics of breast cancer patients.	90
Table 2. Group II Diagnostics. Women with benign breast conditions included in this study and their respective diagnoses.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcentagem
+	Positivo
<	Menor
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mL	Millilitro
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ grama)
°C	Graus Celsius
3'-UTR	Região 3' não traduzida
a.u.	Unidades Arbitrárias (do inglês: "arbitrary units")
ACR	<i>American College of Radiology</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteína quinase B
BI-RADS™	do inglês: " <i>Breast Imaging-Reporting And Data System</i> "
BRCA 1/2	do inglês: " <i>BRCA1/2</i> "
CA 15.3	Antígeno de Carcinoma 15.3 (do inglês: " <i>Carcinoma Antigen 15.3</i> ")
CAE	Antígeno Carcinoma Embrionário (do inglês: " <i>Carcinoembryonic Antigen</i> ")
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCEE	Linhagem tumoral do esôfago humano
CD4	Grupamento de diferenciação 4
cDNA	DNA complementar
CH3	Grupamento metil
CID	Carcinoma Ductal Invasivo
CK	Citoqueratinas
c-myc	do inglês " <i>cell myelocytomatosis</i> "
CTCs	Células Tumorais Circulantes
ctDNA	DNA tumoral circulante (do inglês " <i>Circulating Tumoral DNA</i> ")
ctRNA	RNA tumoral circulante (do inglês " <i>Circulating Tumoral RNA</i> ")
DAB	Diaminobenzidina
DGCR8	do inglês: " <i>DIGeorge-syndrome Critical Region 8</i> "
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRM2	DNA metiltransferase

EGFR	Receptor tipo 1 do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês: “ <i>Epidermal Growth Factor Receptor type 1</i> ”)
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPERP	Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGFRL-1	Receptor do Fator de Crescimento do Fibroblasto 1 (do inglês “ <i>Fibroblast Growth Factor Receptor Like 1</i> ”)
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (do inglês: “ <i>Fluorescence in situ hybridization</i> ”)
GTP	Guanosina trifosfato
H₂O	Molécula da Água
HCT116	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
HER2	Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico humano (do inglês: “ <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2</i> ”)
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1 (do inglês: “ <i>Hypoxia-Inducible Factors</i> ”)
HRP	Do inglês “ <i>HorseRadish Peroxidase</i> ”
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês: “ <i>Insulin-like Growth Factor 1</i> ”)
IGF-1R	Receptor tipo 1 do Fator de Crescimento semelhante à Insulina (do inglês “ <i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i> ”)
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRS 1	Substrato do Receptor de Insulina tipo 1 (do inglês: “ <i>Insulin Receptor Substrate 1</i> ”)
Ki-67	Índice de proliferação celular
KYSE-10	Linhagem tumoral do esôfago humano
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular do Câncer
LMM	Laboratório de Microscopia e Microanálises
MAPK	Via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês “ <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> ”)
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama humano, receptor de estrógeno positivo
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma de mama humano triplo-negativa
miR(s)	microRNA(s)
miRNA(s)	microRNA(s)
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês: “ <i>The mammalian Target Of Rapamycin</i> ”)
NAS	N-acetilserotonina
NCK	Proteína citoplasmática

OncomiR	Fusão dos termos <i>oncology</i> e miRNA
PBS	Solução tampão fosfato (do inglês: " <i>Phosphate Buffered Saline</i> ")
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ")
PHD	Prolil hidroxilase
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase (do inglês: " <i>Phosphoinositide 3-Kinases</i> ")
PLC-γ	Fosfolipase C gamma
PLGF	Fator de crescimento placentário (do inglês: " <i>PLacental Growth Factor</i> ")
pré-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
qPCR	PCR quantitativa em tempo real (do inglês " <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ")
RAS	Proteína RAt Sarcoma vírus
RE	Receptor de Estrógeno
RH	Receptores Hormonais
RISC	do inglês " <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> "
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Receptor de Progesterona
S.E.M	Erro Padrão da Média
SHB	Proteína B do adaptador contendo homologia 2SRC
TGF-β1	Fator de Transformação do Crescimento Beta 1 (do inglês " <i>Transforming Growth Factor Beta 1</i> ")
TN	Triplo Negativos
TNM	Tumor primário (T), Linfonodo (N) e Metástase (M)
TSAα	Proteína do adaptador específico de células T
U6	do inglês " <i>U6 spliceosomal RNA</i> "
UICC	União Internacional de Controle do Câncer
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês: " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ")
VEGFR	Receptor do VEGF (do inglês: " <i>Vascular Endothelial Growth Facto Receptor</i> ")
VHL/pVHL	Proteína <i>Von Hippel-Lindau</i>
VRAP	Receptores associados à proteína VEGF
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, " <i>World Health Organization</i> ")
ΔΔCt	Diferença da diferença do ciclo limiar

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	19
1. Câncer de Mama: aspectos gerais.....	19
2. Métodos de rastreamento para detecção precoce do câncer de mama.....	29
3. Marcadores Tumorais do câncer de mama.....	33
4. Angiogênese.....	37
4.1. HIF-1 α e VHL.....	40
4.2. IGF-1R.....	41
4.3. VEGF.....	42
5. Biópsia líquida.....	44
6. microRNAs: biogênese e função.....	47
7. microRNAs e câncer.....	51
8. miRNAs candidatos: miR-210 e miR-152.....	56
8.1. microRNA-210.....	56
8.2. microRNA-152.....	58
II. OBJETIVOS	62
1. Objetivo geral.....	62
2. Objetivos específicos.....	62
III. CAPÍTULOS	64
1. RESULTADOS.....	64
Artigo.....	64
IV. DISCUSSÃO	100
V. CONCLUSÃO	110
VI. REFERÊNCIAS	112
VII. APÊNDICES	113
VIII. ANEXOS	113

Introdução

I. INTRODUÇÃO

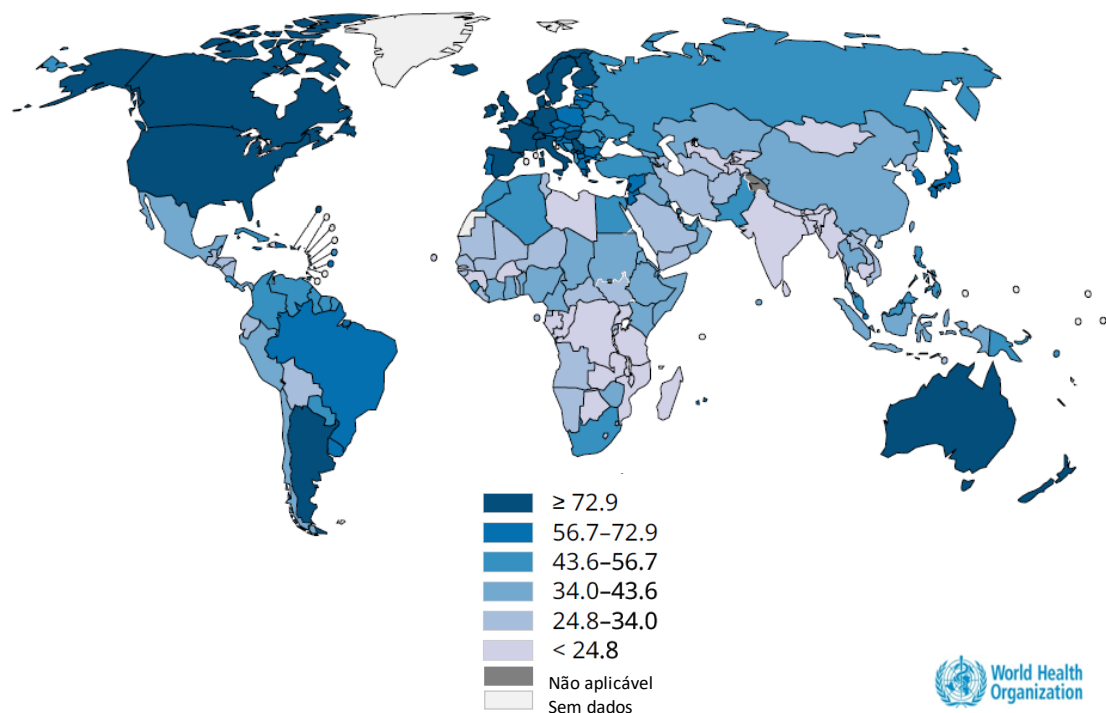
1. Câncer de Mama: aspectos gerais

O câncer de mama é uma grande preocupação mundial pela alta incidência e mortalidade na população feminina (INCA, 2019). A última estimativa mundial, realizada em 2018, pelo *GLOBOCAN* e *International Agency for Research on Cancer* (IARC) apontou que o câncer de mama foi o segundo câncer mais incidente no mundo com 2,1 milhões de novos casos, o que corresponde a 11,6% dos novos casos de câncer a cada ano. Estima-se também que essa neoplasia ocasionou 626.679 mortes em todo mundo no ano de 2018 (GLOBOCAN, 2018).

Existem grandes variações nas taxas de incidência de câncer de mama no mundo. As maiores taxas são observadas em países desenvolvidos e industrializados (América do Norte, Europa do Norte e Ocidental, Austrália e Nova Zelândia) enquanto essas são baixas em países em desenvolvimento (partes da África e da Ásia) (**Figura 1**) (GLOBOCAN, 2018). Uma possível justificativa para esses dados deve-se ao fato de que grande parte da população nos países em desenvolvimento não tem acesso ao diagnóstico. (TORRE; SIEGEL; AHMEDIN, 2015). Outro fator importante que deve ser considerado são os diferentes hábitos de vida em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento, como por exemplo, a alimentação. A relação da obesidade com aumento do risco de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, já está bem consolidada,

e, principalmente em países desenvolvidos, uma proporção substancial da população apresenta obesidade (INCA, 2019).

Figura 1. Estimativa de taxas padronizadas por idade (Mundial) de casos incidentes de câncer de mama em todo mundo em 2018. As maiores taxas são observadas em países desenvolvidos e industrializados enquanto essas são baixas em países em desenvolvimento.

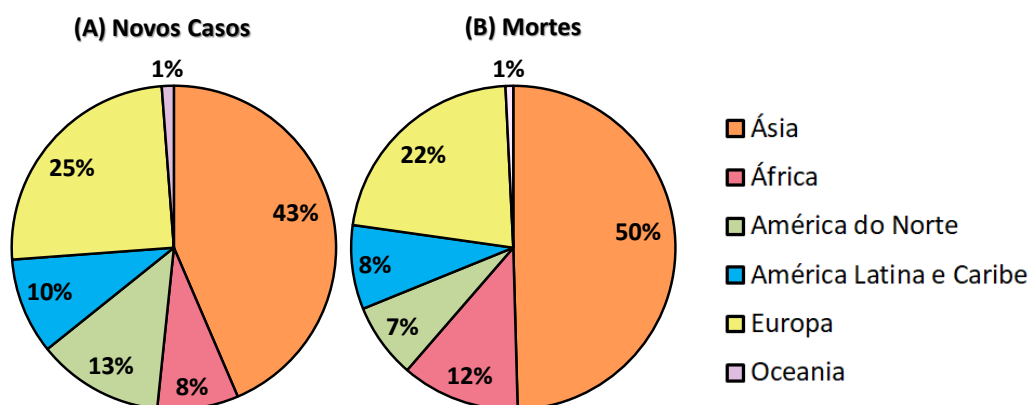


FONTE: Adaptado de GLOBOCAN / World Health Organization (<http://gco.iarc.fr/today>), 2018.

Há também variações nas taxas de incidência *versus* taxas de mortalidade em diferentes regiões do mundo. Por exemplo, embora a América do Norte (com destaque para EUA e Canadá) represente apenas 5% da população mundial, é responsável por 13% dos novos casos, mas apenas 7% dos casos de óbitos para essa neoplasia no mundo. Em contraste, os países africanos (15% da população mundial) representam 8% do total de novos casos, mas 12% dos casos de óbitos (**Figura 2**) (GLOBOCAN, 2018). Ainda, outro estudo revelou que em muitas

populações carentes a maioria das mulheres apresenta doença avançada; o número chega a 78% em mulheres na África do Sul diagnosticadas com câncer de mama nos estágios III e IV. Em contraste, nos EUA, grande parte dos casos é detectada em estágios iniciais da doença (estágios I e II) (DESANTIS et al., 2010).

Figura 2. Distribuição das estimativas de (A) novos casos de câncer de mama e (B) de mortes por câncer de mama por região mundial. O continente africano representa 8% dos novos casos de câncer de mama no mundo e 12% do número de óbitos. Em contraste, a América do Norte representa 13% dos novos casos de câncer de mama no mundo, mas 7% do número de óbitos.




FONTE: Adaptado de GLOBOCAN / World Health Organization (<http://gco.iarc.fr/today>), 2018.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, depois do de pele não melanoma. A estimativa para 2018 foi de 59.700 novos casos que podem ocasionar em óbito devido a um diagnóstico tardio da doença (**Figura 3**). Ainda, o câncer de mama é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil) e Sudeste (69,50/100 mil). A alta incidência pode estar relacionada ao maior acesso aos diagnósticos que

há nestas regiões, devido ao maior grau de desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2018).

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018 no Brasil, exceto pele não melanoma*. Segundo o INCA, no ano de 2018, o câncer de mama representou 29,5% dos novos casos de câncer no país, com uma estimativa de 59.700 novos casos.

	Localização primária	Casos	%
 Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tíreoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FONTE: Adaptado de INCA – Estimativa de câncer de mama no Brasil, 2018.

Há vários fatores associados ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama, entre eles:

1. Idade: mulheres mais velhas, sobretudo a partir dos 50 anos (INCA, 2019).
2. Fatores endócrinos/história reprodutiva: mulheres que tiveram sua primeira gravidez a termo depois dos 30 anos e um menor número de partos; história de menarca precoce; menopausa tardia (após os 55 anos); nuliparidade (não ter tido filhos); e uso de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal pós-menopausa, especialmente se por tempo prolongado (MA et al., 2006; FAUPEL-BADGER et al., 2013; INCA, 2019).

3. Fatores ambientais/comportamentais: ingestão de bebida alcoólica; obesidade e exposição à radiação ionizante. Com relação à dieta, ainda há controversas, com alguns resultados sugerindo que uma dieta saudável está associada a menor risco de câncer de mama, enquanto outros não encontraram associação (LA VECCHIA et al., 2011; TEEGARDEN; ROMIEU; LELIÈVRE, 2012; INCA, 2019).
4. Fatores genéticos/hereditários: presença de mutações em determinados genes transmitidos na família, especialmente BRCA1 e BRCA2 (*BReast CAncer type 1 and 2*); mulheres com histórico de casos de câncer de mama em familiares consanguíneos, sobretudo em idade jovem; de câncer de ovário ou de câncer de mama em homem (INCA, 2019).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea com relação à clínica e à morfologia das células. Em 2012, a IARC publicou a Classificação para Tumores de Mama da Organização Mundial da Saúde, na qual reconhece 20 subtipos diferentes da doença (GOBBI, 2012). A maioria dos casos de câncer de mama é esporádica e apenas 5-10% correspondem a casos de câncer de mama hereditário, dos quais, aproximadamente, 30% são resultantes de mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 (LYNCH; SNYDER; LYNCH, 2012).

De modo geral, o espectro de anormalidades proliferativas nos lóbulos e ductos da mama inclui: hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Carcinomas *in situ* são aqueles nos quais as células

malignas estão confinadas à membrana basal dos ductos e lóbulos. Já os carcinomas invasivos são aqueles em que as células neoplásicas penetram a membrana basal e acometem o estroma. Os carcinomas do tipo não especial (carcinomas ductais invasivos) representam de 70% a 85% dos carcinomas de mama (REISNER, 2016).

Os carcinomas mamários invasivos também são classificados conforme seu grau histológico (sendo eles: grau 1, grau 2 e grau 3). Em geral, menor grau indica um câncer de crescimento mais lento e é menos provável que se as células tumorais se disseminem, enquanto um grau mais alto indica um câncer de maior proliferação celular, com maior probabilidade de disseminação (INCA, 2011).

Em razão da complexidade tumoral do câncer de mama, em 2000, Perou e colaboradores, utilizando a metodologia de *Microarrays* de DNA, pesquisaram 8.102 genes em 65 espécimes tumorais e classificaram as neoplasias mamárias em cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, superexpressor de HER2 (Grupo HER2), luminal HER2 (luminal HER2 positivo ou luminal híbrido) e *basal-like* (PEROU et al., 2000). A partir de então, a avaliação genômica tornou-se padrão ouro para a classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. Entretanto, a metodologia é complexa e possui alto custo, o que dificulta seu uso na prática clínica. Em decorrência disso, trabalhos posteriores mostraram que existe uma forte concordância entre os subtipos moleculares classificados pela técnica de *Microarrays* e aqueles providos pela imunohistoquímica, tornando esse

exame mais utilizado atualmente para classificação molecular (CIRQUEIRA et al., 2011).

Na 12th *St. Gallen International Breast Cancer Conference, 2011* foi adotada pela comunidade científica, a classificação dos subtipos de câncer da mama por meio das técnicas de imunohistoquímica e hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Nessa conferência foi firmado o uso do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do marcador nuclear de proliferação celular (*Ki-67*) para as classificações moleculares e deliberações das estratégias terapêuticas (GOLDHIRSCH et al., 2011).

Assim, ficou determinado que os subtipos luminais A e B possuem positividade para RE e/ou RP e negatividade para HER2, sendo a diferença entre os dois o índice de *Ki-67* (luminal A com índice menor que 14% e o luminal B com índice maior ou igual a 14%). O subtipo Grupo HER2 (superexpressor de HER2) apresenta positividade apenas para oncogene HER2. O subtipo Luminal Híbrido, possui RE e/ou RP positivos e também positividade para o HER2. Por fim, o subtipo triplo negativo (TN) possui negatividade tanto para RE/RP quanto para HER2 (**Quadro 1**) (SERRA et al., 2014).

Para os TN também são avaliados as citoqueratinas 5 e 6 (CK5/6) e o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). Os tumores TN possuem alta frequência de mutações e são subclassificados em TN basalóides (EGFR positivo ou CK5/6 positivo) e TN não basalóides (EGFR

negativo e CK5/6 negativo). Ainda, esse tipo tumoral pode apresentar a classificação *claudin-low*, onde há baixa expressão das claudinas 3, 4 e 7, e de E-caderina nos tumores (**Quadro 1**) (BARROS; LEITE, 2015; CHEN et al., 2018).

Quadro 1. Subtipos moleculares do câncer de mama. A positividade e/ou negatividade de diferentes marcadores tumorais são utilizadas para classificar os subtipos de câncer de mama.

Subtipos moleculares	Marcadores biológicos
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 baixo
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 alto
Luminal Híbrido	RE+ e/ou RP+, HER2+
Grupo HER-2	RE-, RP-, HER2+
Triplo-negativo basalóides	RE-, RP-, HER2-, EGFR+ e CK5/6+
Triplo-negativo não basalóides	RE-, RP-, HER2-, EGFR- e CK5/6-
Triplo-negativo <i>Claudin-low</i>	RE-, RP-, HER2-, Claudina 3,4,7- e E-caderina-

FONTE: Barros & Leite, 2015; Chen et al., 2018.

Com relação ao prognóstico, Sorlie e colaboradores (2003) observaram grandes diferenças evolutivas nos diferentes subtipos, sendo que os carcinomas basalóides e os superexpressores de HER2 foram associados a sobrevidas mais curtas. Ainda, foi visto que os tumores luminais exibem melhor prognóstico, predominantemente o luminal A. Cerca de 90% das pacientes com neoplasias luminais A sobrevivem sem sinais de doença no período de 5 anos (SORLIE et al., 2003).

Assim como em outros tipos de tumor, compreender o estadiamento do câncer de mama é importante para a definição do tipo de tratamento e prever o prognóstico da paciente. A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e a União Internacional de Controle do Câncer (UICC) utilizam o

sistema de classificação TNM como uma ferramenta para os médicos estadiarem diferentes tipos de câncer. Este sistema consiste na avaliação do tumor (T) (aspectos do tumor primário, como o tamanho, quão profundamente se desenvolveu no órgão e quanto invadiu os tecidos adjacentes), linfonodos (N) (ausência/presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais) e metástase (M) (ausência/presença de metástase a distância) (AJCC, 2010; GRESS et al., 2017) (**Quadros 2 e 3**).

Quadro 2. Estadiamento TNM de câncer de mama por agrupamentos. Os estágios do câncer de mama vão desde o estágio 0 até o estágio IV (câncer de mama metastático). Os estágios são determinados pelas informações provenientes do tumor (T), linfonodo (N) e metástase (M).

Estadiamento	TNM
Estágio 0	Tis N0 M0
Estágio I	T1 N0 M0
Estágio IIa	T0 N1 M0
	T1 N1 M0
	T2 N0 M0
Estágio IIb	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
Estágio IIIa	T0 N2 M0
	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
	T3 N2 M0
Estágio IIIb	T4 N0 M0
	T4 N1 M0
	T4 N2 M0
Estágio IIIc	Tqq N3 M0*
Estágio IV	Tqq Nqq M1*

FONTE: AJCC 7th Edition Staging for Breast Cancer, 2010; * qq = qualquer

Quadro 3. Interpretação das siglas da classificação TNM. Neste quadro, estão representados os diferentes valores de TNM e suas respectivas interpretações clínicas.

TNM	INTERPRETAÇÃO
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com até 2 centímetros em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 e até 5 centímetros em sua maior dimensão.
T3	Tumor com mais de 5 centímetros em sua maior dimensão
T4	Qualquer T com extensão para a parede torácica
N0	Ausência de metástase
N1	Linfonodo(s) homolateral(is) móvel(is) comprometido(s)
N2	Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas ou metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral
N3	Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es), ou para linfonodo(s) da mamária interna homolateral clinicamente aparente na presença de evidência clínica de metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), ou metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es) ou da mamária interna
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Presença de metástase a distância (incluindo LFN supraclaviculares)

FONTE: AJCC 7th Edition Staging for Breast Cancer, 2010.

Com o passar dos anos, esse sistema evoluiu abrangendo não apenas um amplo espectro de tumores, mas também incluindo várias atualizações que permitem aos médicos utilizarem novas informações para estratégias de tratamento (AJCC, 2018). A versão mais recente elaborada pelo AJCC para o câncer de mama incorpora fatores biológicos (biomarcadores - RE, RP, HER2, grau histológico, e painel multigênico) ao tradicional sistema de estadiamento anatômico (estadiamento prognóstico clínico). Quando as pacientes são submetidas à ressecção do tumor primário, o estadiamento “prognóstico patológico” é então determinado (este foi utilizado para determinar o prognóstico das pacientes no presente trabalho) (GIULIANO et al., 2017).

2. Métodos de rastreamento para detecção precoce do câncer de mama

O controle do câncer de mama mantém-se como uma das prioridades para os serviços de saúde em face da sua alta incidência e mortalidade na população feminina, e quando detectado nos estágios iniciais (lesões menores que dois centímetros de diâmetro) apresenta prognóstico favorável e elevado percentual de remissão (BLEYER; WELCH, 2012; INCA, 2019).

As estratégias para a detecção efetiva são o diagnóstico precoce – abordagem de pessoas com sinais e/ou sintomas da doença – e o rastreamento – aplicação de teste ou exame em uma população assintomática, com o objetivo de identificar lesões sugestivas de câncer e encaminhar as mulheres com resultados alterados para investigação e tratamento (KERLIKOWSKE et al., 2011; BILLER-ANDORNO; JUNI, 2014).

A mamografia é o teste de rastreamento padrão para detecção dos estágios iniciais do câncer de mama. A idade de início para o rastreamento do câncer de mama por meio de exames de mamografia é controversa. No Brasil, preconiza-se o início do rastreamento mamográfico em mulheres com idade entre 50 e 69 anos e período máximo de 2 anos entre os exames. Em mulheres com histórico familiar de câncer de mama, recomenda-se iniciar o rastreamento mamográfico dez anos antes da idade

na qual a doença foi diagnosticada em parente de primeiro grau, porém não antes dos 30 anos (INCA, 2015).

Na busca pela padronização dos laudos mamográficos, foi adotado como consenso o modelo BI-RADS™ (*Breast Imaging Reporting And Data System*), classificação desenvolvida em 1993 pelo *American College of Radiology* (ACR) visando, principalmente, propiciar uma orientação ao médico quanto à conduta a ser tomada de acordo com achados mamográficos — negativos, benignos, provavelmente benignos, suspeitos e altamente suspeitos —, sendo este modelo útil como preditor de malignidade (VIEIRA; TOIGO, 2002). Vários aspectos no filme mamográfico são observados para determinar a classificação BI-RADS™, como por exemplo: presença de nódulos, margens e densidade dos nódulos (se presente), presença e distribuição de calcificações, distorções arquiteturais mamárias, entre outros (KOPANS, 2007). As categorias desse modelo estão listadas no **Quadro 4**.

Quadro 4. Categoria BI-RADS™ e seus respectivos significados clínicos. Os valores de BI-RADS™ é uma padronização dos laudos mamográficos e estes indicam a possibilidade de um determinado achado ser câncer de mama.

Categoria BI-RADS™	Significado
BI-RADS 0	Exame indeterminado que necessita de outros exames complementares.
BI-RADS 1	Exame normal.
BI-RADS 2	Alterações benignas.
BI-RADS 3	Alterações <i>provavelmente</i> benignas. Implica acompanhamento a curto prazo (6 meses).
BI-RADS 4	Alterações suspeitas de malignidade com indicação para biópsia. A classificação BI-RADS 4 costuma ser dividida em 3 subcategorias de acordo com o risco de câncer: 4A - Lesão com baixa suspeita de malignidade – 2 a 10% de risco de câncer. 4B - Lesão com moderada suspeita de malignidade – 11 a 50% de risco de câncer. 4C - Lesão com elevada suspeita de malignidade – 51 a 95% de risco de câncer.
BI-RADS 5	Alterações fortemente suspeitas de malignidade – Biópsia obrigatória.
BI-RADS 6	Exame com lesão maligna previamente conhecida.

FONTE: Adaptado de Vieira & Toigo, 2002.

Vale ressaltar que o rastreamento é uma estratégia dirigida às mulheres na faixa etária em que os benefícios alcançados (como redução da mortalidade, por exemplo) seja mais favorável que os malefícios para as pacientes (CHUBAK et al., 2010). Entre os malefícios, estão: resultados falso-negativos e falso-positivos (causando impacto na qualidade de vida, como aumento da ansiedade ou falsa tranquilidade); o sobrediagnóstico e o sobretratamento (relacionados à identificação de tumores com

comportamento indolente) e o risco da exposição à radiação ionizante (BRODERSEN; SIERSMA, 2013).

Além disso, estudos mostraram que muitas lesões mamárias classificadas como BI-RADS™ 4 (principalmente a e b) são biopsiadas desnecessariamente, submetendo a mulher a processos invasivos além ocasionar em gastos desnecessários para a realização das biópsias (WIRATKAPUN et al., 2010). Gotzsche & Jorgensen (2013) em um estudo envolvendo um centro de rastreamento de câncer de mama nos EUA, mostraram que um em cada três casos diagnosticados por laudos mamográficos eram são falso-positivos e que as taxas de falso-negativos eram em torno de 19% (GOTZSCHE; JORGENSEN, 2013).

Segundo o ACR a densidade mamária é outro fator limitante para os laudos mamográficos, pois mamas classificadas em grau 3 (50% a 75% de densidade glandular) e grau 4 (mais de 75% de densidade glandular) apresentam uma diminuição da acuidade da mamografia. Ainda, mamografia de rastreamento em mulheres com densidade mamária de grau 4 pode apresentar uma sensibilidade de apenas de 30% (MARTIN; BOYD, 2008; BAUM, 2015). A razão para isso se deve ao fato de que os tecidos epiteliais e estromal possuem as mesmas propriedades de atenuação radiográfica que os tumores. Ainda, segundo a OMS, a inclusão de mulheres entre 40 a 49 anos de idade no rastreamento mamográfico tem limitada evidência de redução da mortalidade, pois mulheres em pré-

menopausa apresentam maior densidade mamária (MARTIN; BOYD, 2008).

Neste contexto, considerando-se o fato que o diagnóstico precoce está relacionado a uma diminuição na taxa de mortalidade por câncer de mama e, levando-se em conta que o método de rastreamento tem apresentado limitações, a busca de biomarcadores tumorais que possam, juntamente com a mamografia, melhorar o diagnóstico e o prognóstico das pacientes, é de especial interesse para a comunidade científica.

3. Marcadores Tumorais do câncer de mama

Marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, sangue ou em outros fluidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (CAPELOZZI, 2001; STRACHAN; READ, 2013). Esses podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (HUO et al., 2016). Bons marcadores tumorais são capazes de diferenciar tecidos normais de neoplásicos, além de serem caracterizados ou quantificados por procedimentos relativamente práticos (ANDRIOLO, 1996).

Alguns dos principais marcadores tumorais de câncer de mama com recomendações na prática clínica são (EISENBERG; KOIFMAN, 2001):

- Marcadores associados ao tecido: receptores hormonais – RH* (RP e RE);
- Marcador de proliferação celular: Ki-67*;
- Marcadores genéticos: oncogene HER2* (c-erbB-2) e BRCA1/BRCA2;
- Marcadores no sangue e no tecido: CEA (antígeno carcino-embrionário) e CA 15.3 (antígeno de carcinoma).

Marcadores imunohistoquímicos* como os RH e o HER2 já são bem estabelecidos na resposta terapêutica, enquanto o Ki-67 está relacionado ao prognóstico (DUFFY et al., 2017). A positividade dos RH (RE e/ou RP) – cerca de dois terços dos carcinomas de mama – está associada com um prognóstico mais favorável e resposta a terapia hormonal, tal como o tamoxifeno e os inibidores da aromatase. Os carcinomas de mama que exibem amplificação do proto-oncogene c-erbB-2 (HER+) apresentam prognóstico mais reservado. A maioria dos tumores HER+ respondem melhor a quimioterapia não hormonal (EISENBERG; KOIFMAN, 2001). Estudos mostram que o trastuzumabe (Herceptin®), anticorpo monoclonal contra o sítio extracelular do HER2, é uma terapia que está bem estabelecida para este subtipo molecular (HADDAD, 2010; HSIAO et al., 2010).

Tumores que expressam o índice de proliferação Ki-67 (proteína nuclear não histona encontrada em todas as fases do ciclo celular, menos na G₀) em proporção igual ou menor do que 10% apresentam crescimento

lento e os que expressam acima de 30% seriam os mais agressivos. A faixa entre 10-30% é duvidosa e em algumas situações é recomendável teste genético para melhor classificação (ZHAO et al., 2014).

Outros marcadores genéticos para o câncer de mama são os genes BRCA1 e BRCA2. Estima-se que 5 a 10% dos casos de câncer de mama são hereditários, sendo que uma parcela destes está associada a mutações nestes genes, herdados de maneira autossômica dominante com elevada penetrância. Os BRCA1 e BRCA2 atuam como supressores tumorais e estão relacionados aos aspectos centrais do metabolismo celular, tais como reparo de danos ao DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular (CLAUS et al., 1996; ZHANG; POWELL, 2005; HUEN; SY; CHEN, 2010; ZHANG et al., 2012).

O antígeno carcinoembrionário (CEA) e antígeno de carcinoma 15.3 (CA 15.3) pertencem a uma família de glicoproteínas de superfície celular. O aumento contínuo do nível de CEA no câncer de mama pode explicar a não resposta ou a recorrência ao tratamento. Além disso, pacientes com câncer avançado ou metastático podem apresentar níveis mais altos de CEA. O antígeno de carcinoma 15.3 (CA 15.3) é o biomarcador de câncer de mama utilizado na rotina clínica atual para casos selecionados. No entanto, em pacientes com estágio inicial da doença, ele é capaz de detectar somente 23% dos casos (DUFFY; EVOY; MCDERMOTT, 2010; NIEDER et al., 2017).

Os avanços no conhecimento da Biologia Molecular tem proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam o processo carcinogênico, permitindo o surgimento de biomarcadores de câncer mais sensíveis, baseados em perfil genômico, análises de transcriptoma, ou proteomas (DALTON; FRIEND, 2006; STRACHAN; READ, 2013). Nos últimos anos, pesquisas estão investindo em testes genéticos que avaliam o risco de desenvolvimento de diversas patologias hereditárias e auxiliam na definição da melhor terapia (VALENCIA et al., 2017).

O *Oncotype DX* é um ensaio específico que utiliza 21 genes (16 genes do câncer e 5 genes de referência) com base em seu valor preditivo e prognóstico, em pacientes com linfonodos negativos e RE positivo, tratadas com tamoxifeno. Outra utilidade importante do *Oncotype DX* é sua capacidade de prever os benefícios da quimioterapia adjuvante (MCVEIGH; KERIN, 2017; XIN et al., 2017). O *Mamaprint*, por sua vez, avalia a expressão de 70 genes relacionados a recorrência de câncer de mama para classificar cada paciente com esta neoplasia em “baixo risco” ou “alto risco” de desenvolver metástase nos dez primeiros anos após o diagnóstico, indicando quais pacientes de baixo risco não são indicadas a quimioterapia (BEUMER et al., 2016; XIN et al., 2017).

Apesar dos esforços na busca de marcadores tumorais para detecção precoce do câncer de mama, definição do prognóstico e terapias, ainda não foi identificado um marcador tumoral para o câncer de mama

com acurácia e exatidão necessárias, além do benefício de poder ser detectado de forma rápida e simples. Neste contexto, são crescentes os estudos que mostram os microRNAs como potenciais biomarcadores pois estão envolvidos em vários processos essenciais à progressão tumoral (MITCHELL et al., 2008; SHARMA; KELLY; JONES, 2009).

4. Angiogênese

A evolução maligna de uma neoplasia ocorre quando as células se desprendem e se espalham para outras regiões do corpo, levando à metástase e corroborando com a agressividade tumoral (MCGUIRE; BROWN; KERIN, 2015). Para que isso ocorra, a angiogênese, ou crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, é imprescindível para a progressão do tumor primário, assim como para a formação das metástases (KARAMYSHEVA, 2008; CRAWFORD; FERRARA, 2009).

No início da progressão do câncer, as células tumorais que se localizam em um raio máximo de 100 a 200 μm de distância dos vasos sanguíneos, distância limite de difusão para o oxigênio, conseguem receber nutrientes e oxigênio por difusão simples para a manutenção e crescimento da massa tumoral (PARK et al., 2013). Porém, quando o tumor excede 1-2 mm de diâmetro, apresenta um menor fornecimento de metabólitos devido à restrita irrigação sanguínea, principalmente nas regiões mais internas e distantes da massa tumoral. Com a insuficiência do

processo de difusão e, portanto, a falta de oxigênio, a hipóxia desencadeia uma cascata de eventos de sinalização que dá início à angiogênese (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; SORLIE et al., 2003). Neste caso, há a necessidade de recrutamento de novos vasos sanguíneos por vasculogênese, que devido ao ambiente anormal do tumor, pode recrutar células precursoras de vasos sanguíneos (LI et al., 2015; WANG et al., 2015).

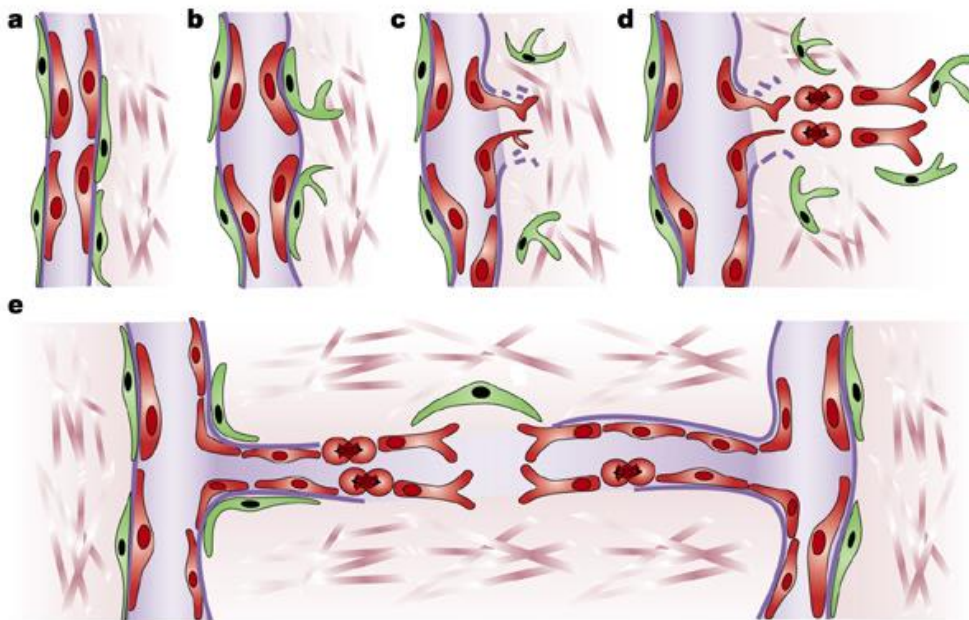
Assim, a angiogênese é fundamental para que a célula tumoral mantenha suas funções metabólicas e biológicas, favorecendo o crescimento e progressão tumoral, e fornecendo rotas potenciais para a disseminação do tumor através das metástases (BOUDREAU; MYERS, 2003; TOMINAGA; KATSUDA; OCHIYA, 2015).

Vasos tumorais são distintos de vasos normais, possuem forma irregular, e não estão organizados em veias, artérias e capilares. Regulando a função vascular estão envolvidas as células endoteliais e os pericitos, células mesênquimais de suporte perivascular. Assim para garantir um suporte mecânico e estabilidade, as células endoteliais estão localizadas na parede interna dos vasos sanguíneos e os pericitos ficam em torno das células endoteliais (BERGERS; BENJAMIN, 2003; GERHARDT et al., 2003; CAPPELLARI; COSSU, 2013).

No processo de angiogênese os vasos sanguíneos são formados a partir de capilares ou vênulas já existentes, por meio de estimulação de fatores pró-angiogênicos (a). Primeiramente os pericitos se destacam e os

vasos dilatam (b). Assim, células endoteliais migram para o espaço perivascular (c). Guiadas pelos pericitos, as células endoteliais proliferam (d). As células endoteliais aderem umas às outras, formando um lúmen, que é suportado pelos pericitos (e) (BERGERS; BENJAMIN, 2003) (**Figura 4**).

Figura 4. Etapas da angiogênese. A angiogênese é um processo complexo que envolve uma série de etapas até a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes.



FONTE: de Bergers & Benjamin, 2003.

A angiogênese tumoral é um processo muito complexo e pode ser regulada por diversos mecanismos envolvendo todo o microambiente tumoral (CASTAÑEDA-GILL; VISHWANATHA, 2016). O Receptor tipo 1 do Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF-1R) quando ativo, pode regular a angiogênese por meio do aumento dos níveis do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (SAMANI et al., 2007). Além

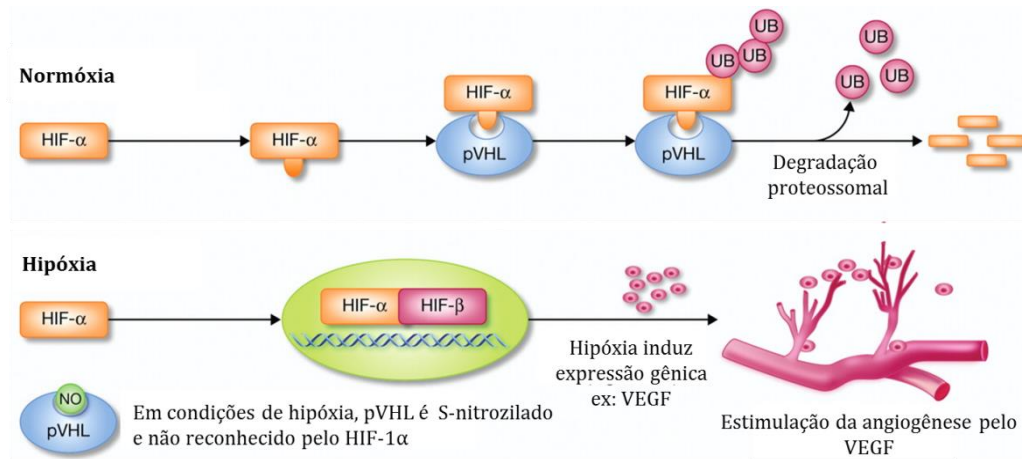
disso, a hipóxia, modula a expressão do Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa (HIF- α), ocorrendo um aumento dos níveis de VEGF (RAHIMI, 2012).

4.1. HIF-1 α e VHL

Durante o crescimento tumoral, são formadas áreas de hipóxia e as células tumorais sofrem adaptações, principalmente pela ativação do HIF-1 (CARMELIET; RAKESH, 2011; RUNDQVIST; JOHNSON, 2013). HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico constituído por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β (KARAKASHEV; REGINATO, 2015). Sob condições fisiológicas normais, a normóxia, HIF-1 β é expresso e HIF-1 α é mantido em níveis baixos. No caso da hipóxia, as células tumorais aumentam a expressão do HIF-1 α (SEMENZA, 2002) que é responsável pelo controle da expressão de vários genes envolvidos no metabolismo da glicose, angiogênese e outros (KE; COSTA, 2006).

Na normóxia, o HIF-1 α é hidroxilado por proteínas que contêm domínio prolil hidroxilase (PHD), então se liga a pVHL, um supressor tumoral, e é degradado por um proteassoma. Sob condições de hipóxia, a ligação HIF-1 α -pVHL não ocorre, pois não há hidroxilação de HIF-1 α pela enzima PHD e o pVHL é S-nitrozilado, portanto, a produção de HIF-1 α é estimulada e a sua degradação é bloqueada. O HIF-1 α , por sua vez, se move para o núcleo, onde estimulará à expressão de vários genes que contribuem para a angiogênese, como o VEGF (**Figura 5**) (RAHIMI, 2012; KARAKASHEV; REGINATO, 2015).

Figura 5. Ativação do HIF-1 α . Em situações de normóxia, a proteína pVHL promove a ubiquitinação de HIF-1 α levando a sua degradação proteossomal. Já em situações de hipóxia, a ligação pVHL-HIF-1 α não ocorre e, portanto, HIF-1 α não é degradado.



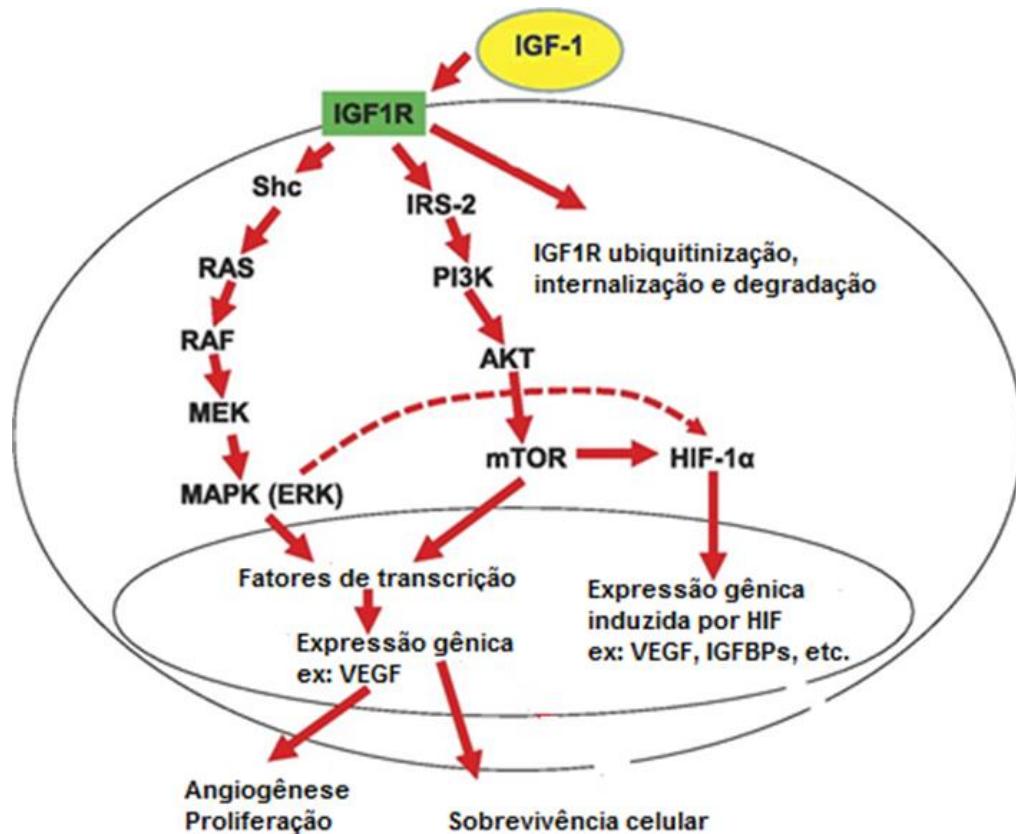
FONTE: Adaptado de Rahimi, 2012.

4.2. IGF-1R

A ativação da via de sinalização IGF-1R promove a angiogênese, proliferação, sobrevivência e metástase de células de câncer de mama. O IGF-1R é um receptor tetramérico composto de duas subunidades β e duas subunidades α (MOTALLEBNEZHAD et al., 2016). A ativação desse receptor está envolvida com diversas vias, quando o Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF-1) se liga, ativa a via da tirosina quinase intrínseca e a fosforilação de membros da família do Substrato do Receptor de Insulina (IRS). Essa ligação ocasiona a ativação da via proteína quinase ativada por Ras – MAPK e a via fosfatidilinositol-3 quinase PI3K/AKT/mTOR. Ainda, a cascata MAPK pode levar à indução de expressão de genes como o VEGF, e a cascata PI3K/AKT através da via mTOR, induz a expressão de HIF-1 α e VEGF (**Figura 6**) (CHIU et al., 2011).

A ativação dessas vias induz, além da angiogênese, a proliferação e a sobrevivência celular (CHIU et al., 2011; XU et al., 2013).

Figura 6. Via de sinalização do IGF-1R. Diversas proteínas estão envolvidas nas vias de sinalização de IGF-1R após ligação de IGF-1. A ativação destas vias promove a angiogênese, proliferação e sobrevivência celular.



FONTE: Adaptado de Chiu et al., 2011.

4.3. VEGF

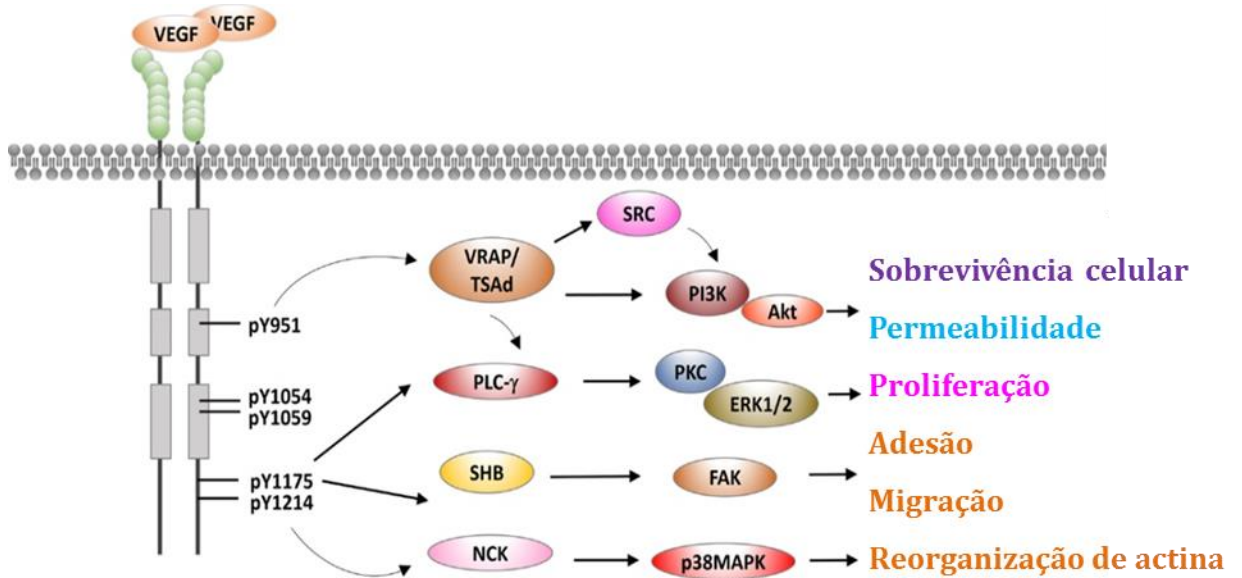
O VEGF está diretamente envolvido na angiogênese e sua família inclui oito membros, VEGF-A (também conhecido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, VEGF-F, Fator de Crescimento Placentário 1 e 2 (PLGF-1 e PLGF-2). Estes se ligam em receptores tirosina quinase:

Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular tipo 1 - VEGFR-1, tipo 2 - VEGFR-2, e tipo 3 - VEGFR-3 (KIERAN; KALLURI; CHO, 2012; KRISTENSEN et al., 2014).

O receptor VEGFR-1 está localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, já o receptor VEGFR-2 é encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR-3 exclusivo do endotélio linfático. A interação do VEGF-A e seu receptor VEGFR-2 é predominante para a angiogênese (STEFANINI et al., 2008; TANEJA et al., 2010). No câncer de mama o VEGF vem sendo relacionado como principal fator envolvido na angiogênese, sendo que este é detectado em células tumorais, e seu receptor VEGFR-2 detectado em células endoteliais (KRISTENSEN et al., 2014).

Quando o VEGF se liga a VEGFR-2, ocorre uma dimerização do receptor, que é autofosforilado. Os resíduos de tirosina fosforilados Y951, Y1054, Y1059, Y1175 e Y1214 servem de ligação para proteínas adaptadoras, incluindo VRAP/TSA α , PLC- γ , SHB e NCK. Esses são responsáveis pelo efeito da ligação VEGF-VEGFR-2, incluindo a proliferação celular, permeabilidade, sobrevivência celular e migração celular (**Figura 7**) (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; ZHU; ZHOU, 2015).

Figura 7. Ação do VEGF. Diversas proteínas estão envolvidas na ligação de VEGF e VEGFR-2. A ligação destes fatores pode levar à sobrevivência celular, aumento da permeabilidade, proliferação, adesão, migração e reorganização de actina.



FONTE: Adaptado de Zhu & Zhou, 2015.

Assim a ligação VEGF-VEGFR-2 pode desencadear proliferação, brotação e formação de tubos de células endoteliais; aumentar a permeabilidade vascular; suprimir a apoptose para a estabilização do vaso; recrutamento de células imunes a supressão da resposta imune antitumoral; e na promoção do crescimento tumoral; e promovendo a angiogênese sustentada (GERHARDT et al., 2003).

5. Biópsia líquida

Atualmente, a caracterização de diversos tipos de neoplasia tem sido realizada em amostras obtidas a partir de uma biópsia do tumor ou de ressecção cirúrgica. No entanto, existem riscos cirúrgicos (dificuldade de acesso em alguns locais anatômicos) e clínicos (contaminação dos tecidos

circunvizinhos com células tumorais) inerentes a estes procedimentos que podem aumentar os riscos de lesões metastáticas (ROBERTSON; BAXTER, 2011). Ainda, há situações em a que biópsia deve ser repetida, como no caso em que a quantidade de material não foi suficiente para todos os testes necessários, e também se o tumor não for homogêneo e/ou estiver evoluindo junto com a doença. Por fim, a metodologia é relativamente demorada e envolve um alto custo financeiro por demandar todo um aparato cirúrgico e equipe de médicos e enfermeiros (GORGANNEZHAD et al., 2018).

Nos últimos anos, a biópsia líquida vem ganhando espaço como uma ferramenta de detecção promissora para tumores, com o benefício de ser menos invasiva do que um procedimento padrão de biópsia de tecido (AARTHY et al., 2015; JOOSSE; GORGES; PANTEL, 2015). Este procedimento consiste na coleta de qualquer fluido corpóreo com o propósito de analisar informações provenientes do tumor, incluindo células tumorais circulantes (CTCs) (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2013; ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016; DI NUNNO et al., 2018; HABER; VELCULESCU, 2014; WU et al., 2018), ácidos nucléicos circulantes (ctDNA e ctRNA) (HEITZER; ULZ; GEIGL, 2015; IGNATIADIS; LEE; JEFFREY, 2015; WAN et al., 2017) e exossomos (BECKER et al., 2016; BACH et al., 2017;; KALISHWARALAL; KWON; PARK, 2018) (**Figura 8**).

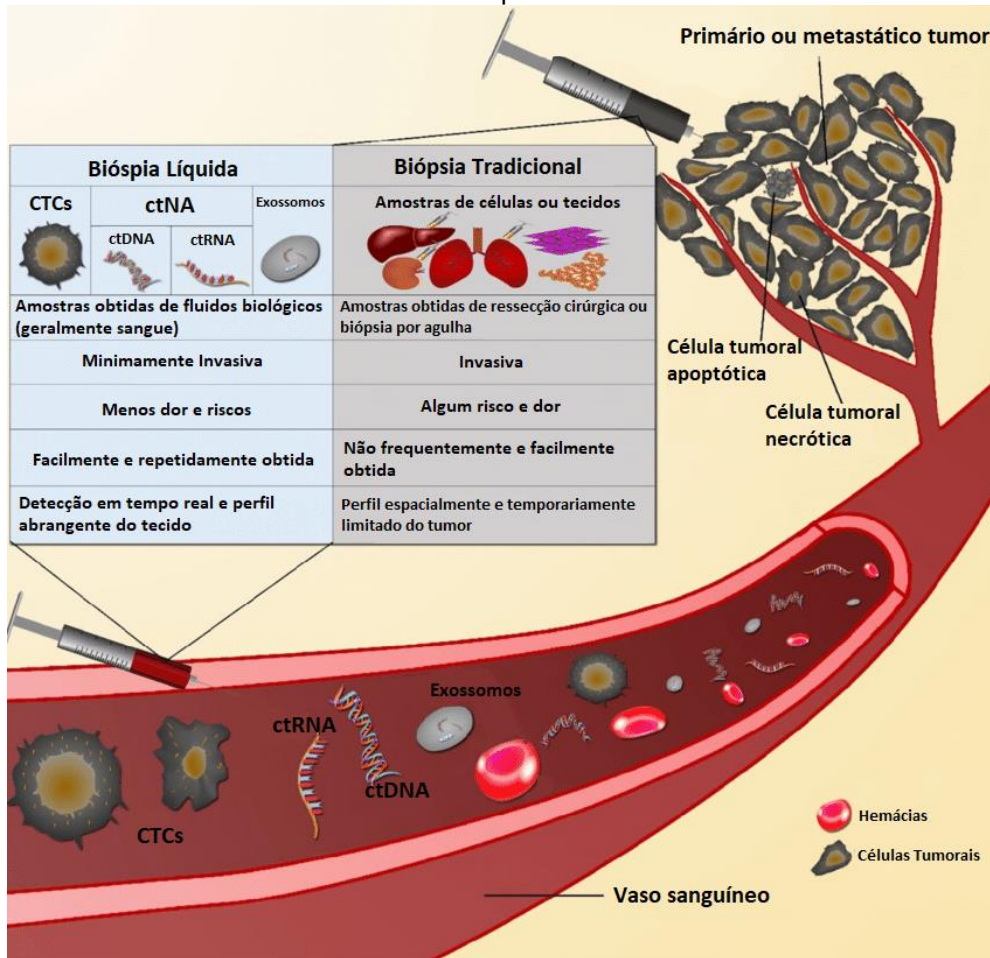
Dentre o os fluidos, o sangue apresenta um bom potencial para carrear marcadores, pois circula por todo o corpo transportando nutrientes,

proteínas, hormônios e células, refletindo a somatória de processos fisiológicos e patológicos que ocorre em um indivíduo. Assim, a fácil obtenção desse fluido, aliada à correlação do perfil de moléculas extracelulares em diversas doenças humanas abriu novas frentes de estudos e gerou perspectivas para o diagnóstico de neoplasias (DUFFY; EVOY; MCDERMOTT, 2010; QI et al., 2018).

Além de ser minimamente invasiva ocasionando menor risco e dor para o paciente, a biópsia líquida permite: detecção precoce, o que possibilita maior potencial da eficiência do tratamento; rastreamento de alterações tumor-específicas durante o curso da doença; coletas seriadas e mais representativas da heterogeneidade do tumor; avaliação da resposta ao tratamento e prognóstico (HABER; VELCULESCU, 2014; IGNATIADIS; LEE; JEFFREY, 2015; GORGANNEZHAD et al., 2018).

A presença de ácidos nucleicos no sangue é conhecida desde a década de 50, embora seu uso como ferramenta diagnóstica seja recente e se concentre no campo da oncologia fundamentalmente (CROWLEY et al., 2013). Com o avanço da biópsia líquida, vem sendo desenvolvida uma série crescente de pesquisas com o propósito de descoberta de novos biomarcadores circulantes que sejam mais sensíveis, caracterizando subtipos específicos de cada tipo tumoral (ALVES; DELMONICO, 2015). Entretanto, ainda é escasso o número de biomarcadores circulantes para detecção precoce do câncer de mama que estejam em uso na rotina clínica (MADHAVAN et al., 2013).

Figura 8. Biópsia Líquida. Esta técnica consiste na coleta de fluidos biológicos, com destaque para o sangue, para analisar informações provenientes do tumor como CTCs, exossomos e DNA e RNA circulantes (ctDNA/RNA). Algumas vantagens da biópsia líquida são: minimamente invasiva e facilmente e repetidamente obtida.



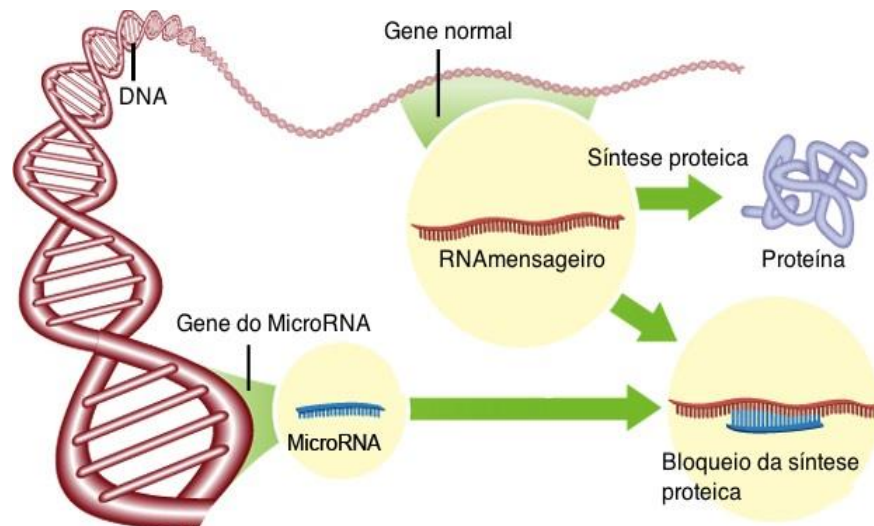
FONTE: Adaptado de QI et al., 2018.

6. MicroRNAs: biogênese e função

Descobertos por Lee e colaboradores, por meio de estudos voltados para a biologia do desenvolvimento em *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), os microRNAs (miRNAs; miRs) são pequenas moléculas de RNA não-codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que controlam numerosas vias celulares por meio da regulação da expressão

gênica em fase pós-transcricional (CALIN et al., 2005; YANG; HAO; XI, 2013). Os mecanismos de ação dessas moléculas ocorrem por meio do pareamento específico com moléculas alvos de RNA mensageiro (mRNA) podendo induzir à superexpressão ou silenciamento gênico, ocasionando a estabilização ou degradação desta molécula (KIRTON et al., 2010; SCHRAUDER et al., 2012) (**Figura 9**).

Figura 9. Mecanismo tradicional já descrito de ação do miRNAs. O principal mecanismo de ação dos miRNAs acontece por bloqueio da síntese proteica pelo pareamento específico do miRNA com o RNA mensageiro-alvo.



FONTE: Adaptado de Kirton et al., 2010.

Somente em plantas o pareamento é perfeito entre miRNAs e os genes-alvo. Já nos demais organismos esse pareamento é imperfeito e ocorre, principalmente, entre uma sequência de 6-8 nucleotídeos (sequência *seed*) com a região 3'-UTR do mRNA alvo (GULYAEVA; KUSHLINSKIY, 2016). Um miRNA pode regular diversos mRNAs, um mRNA pode ser alvo de diversos miRNAs e, além disso, diversos genes podem regular um determinado miRNA. Os miRNAs são reguladores de

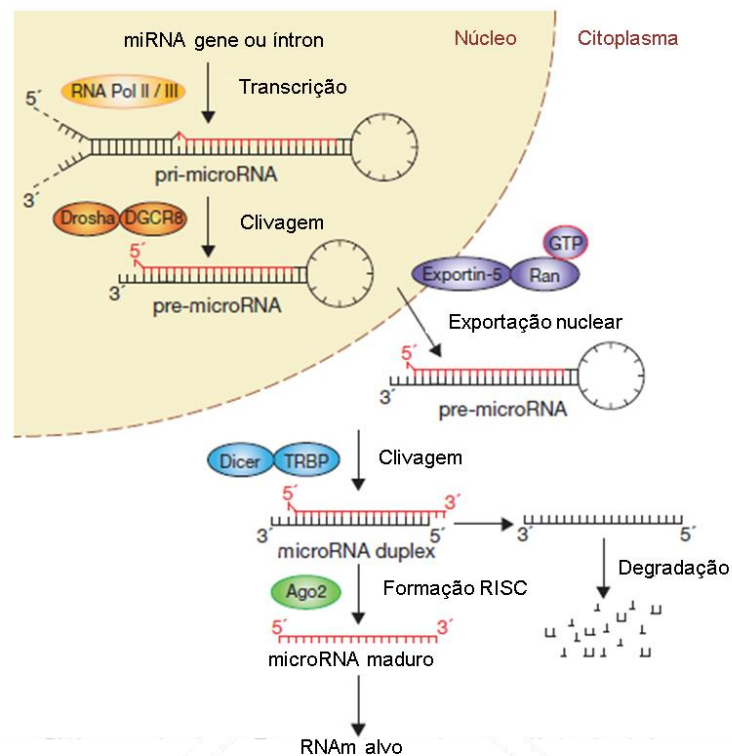
mais de 30% de todos os genes que estão localizados dentro de íntrons de regiões codificantes ou não (AGOSTINI et al., 2010).

Outros mecanismos de ação dos miRNAs já foram identificados, como o silenciamento transcricional e outros considerados inesperados. No silenciamento transcricional mediado por miRNAs, o complexo miRNA e RISC (do inglês *RNA-Induced Silence Complex*) seria capaz de se ligar ao transcrito nascente, recrutando a DNA metiltransferase (DRM2), que promoveria a metilação (-CH₃) de sequências próximas no DNA. Essa modificação levaria ao silenciamento do gene-alvo (WU et al., 2010). Além disso, mecanismos inesperados foram descritos, como a promoção da transcrição ocasionada pelo let-7i sobre o promotor do gene da Interleucina 2 (IL-2) em linfócitos T CD4+ (ZHANG et al., 2014) e o aumento da eficiência de tradução ocasionada pelo miRNA-10a, este se liga a proteínas ribossômicas e aumenta a tradução em células embrionárias implantadas em camundongos (ØROM; NIELSEN; LUND, 2008).

No núcleo, os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II/III a partir de seu gene ou de regiões intrônicas em pri-miRNA, molécula de cadeia longa. Esse transcrito primário contém uma extremidade 5' cap e uma extremidade 3' com cauda poli A (HE; HANNON, 2004). O pri-miRNA apresenta uma estrutura denominada *hairpin* que é clivada pela enzima *Drosha* e seu cofator DGCR8 (do inglês '*DiGeorge syndrome critical region gene 8*') no núcleo, gerando uma molécula precursora do miRNA maduro (pré-miRNA) que apresenta aproximadamente 70 nucleotídeos (LEE et al.,

2003; WINTER et al., 2009). Em seguida, o pré-miRNA é transportado rapidamente ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5) (juntamente com uma molécula Ran e GTP) e é processado pelo complexo *Dicer*, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto é incorporado ao complexo RISC, que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo. A outra fita pode ser degradada ou, posteriormente, também pode acoplar-se ao complexo RISC (**Figura 10**) (ACUNZO et al., 2015; BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015).

Figura 10. Biogênese dos miRNAs. Os precursores dos miRNAs são transcritos no núcleo e posteriormente processados por complexos proteicos. A maturação dos miRNAs termina no citoplasma onde a última etapa é caracterizada pela formação do complexo RISC-miRNA.



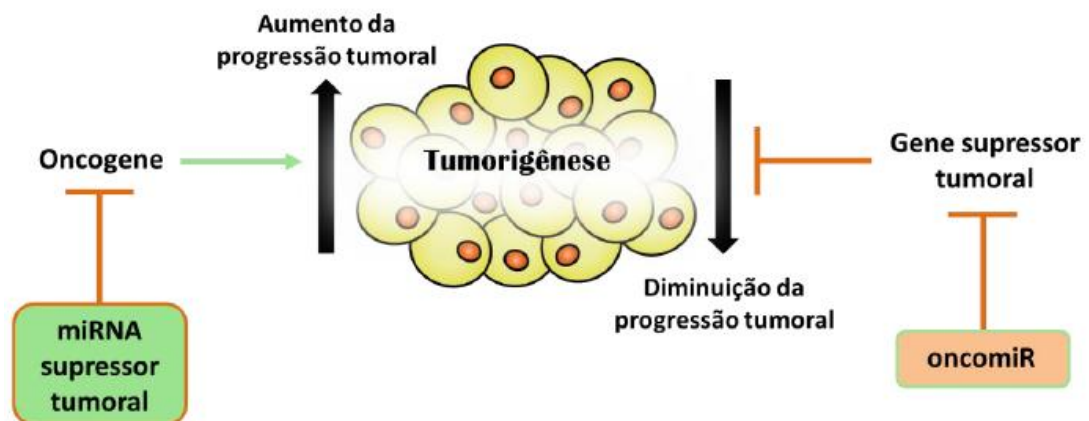
FONTE: Adaptado de Winter et al., 2009.

7. MicroRNAs e câncer

Em 2002, foi relatada pela primeira vez, a desregulação de miRNA no câncer, descrevendo a deleção ou regulação negativa de miR-15a e miR-16-1 na leucemia linfocítica crônica (CALIN et al., 2002). Desde então, os miRNAs tem recebido especial interesse na oncologia, com vários estudos demonstrando diferentes perfis de expressão e regulação de miRNA em neoplasias humanas em comparação com tecidos normais. Com efeito, a expressão de miRNA aberrante em tumores humanos não é apenas uma associação ocasional, uma vez que exerce um papel determinante em diferentes etapas do processo tumorigênico (BARTEL, 2009; DUTTAGUPTA et al., 2011; AMORIM et al., 2016).

Na carcinogênese, os miRNAs podem ser classificados em miRNAs oncogênicos (oncomiRs) ou miRNAs supressores tumorais. OncomiRs agem por meio da repressão da expressão de genes supressores de tumores e são frequentemente regulados positivamente em cânceres. Já os miRNAs supressores de tumor controlam oncogenes e são frequentemente reprimidos no câncer (**Figura 11**) (SHAH et al., 2013). No entanto, esta classificação para miRNAs pode ser imprecisa e muitos estudos têm mostrado que miRNAs podem apresentar dupla função, com propriedades supressoras de tumores ou oncogênicas, dependendo do tipo de tumor e do contexto celular (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006; KEKLIKOGLOU et al., 2012).

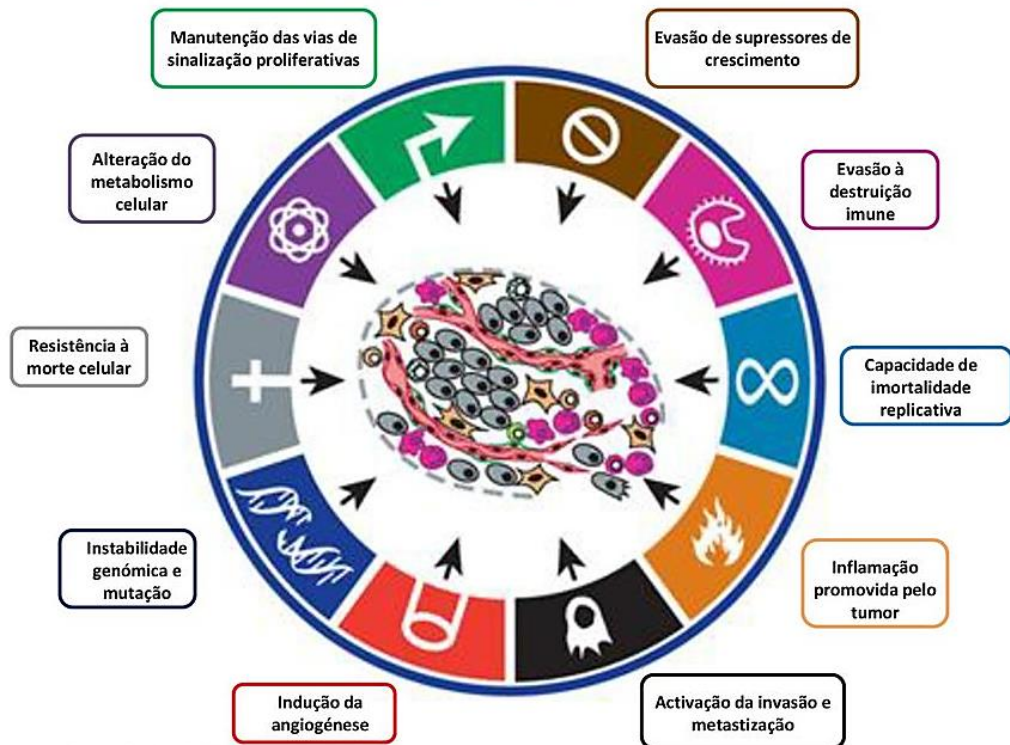
Figura 11. Ação dos miRNAs na tumorigênese. Na tumorigênese, os miRNAs podem agir como supressores tumorais, bloqueando a ação de oncogenes e favorecendo o aumento da progressão tumoral. Ou ainda, podem agir como oncogenes (oncomiR), bloqueando a ação de genes supressores tumorais e inibindo a ação destes na diminuição da progressão tumoral.



FONTE: Adaptado de Shah et al., 2013.

De acordo com Hanahan e Weinberg (2000), as células tumorais adquirem certas capacidades, também chamadas de *hallmarks* do câncer, sendo elas: proliferação acelerada com perda do controle do crescimento; evasão a apoptose, potencial ilimitado de replicação, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, os mesmos pesquisadores observaram que o tumor adquire características que possibilitam disseminação, proliferação e sobrevivência devido a quatro alterações celulares: desregulação do metabolismo energético, instabilidade genômica e mutações; proteção contra o sistema imune e promoção dos processos inflamatórios (*Hallmarks of cancer - next generation*) (Figura 12) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

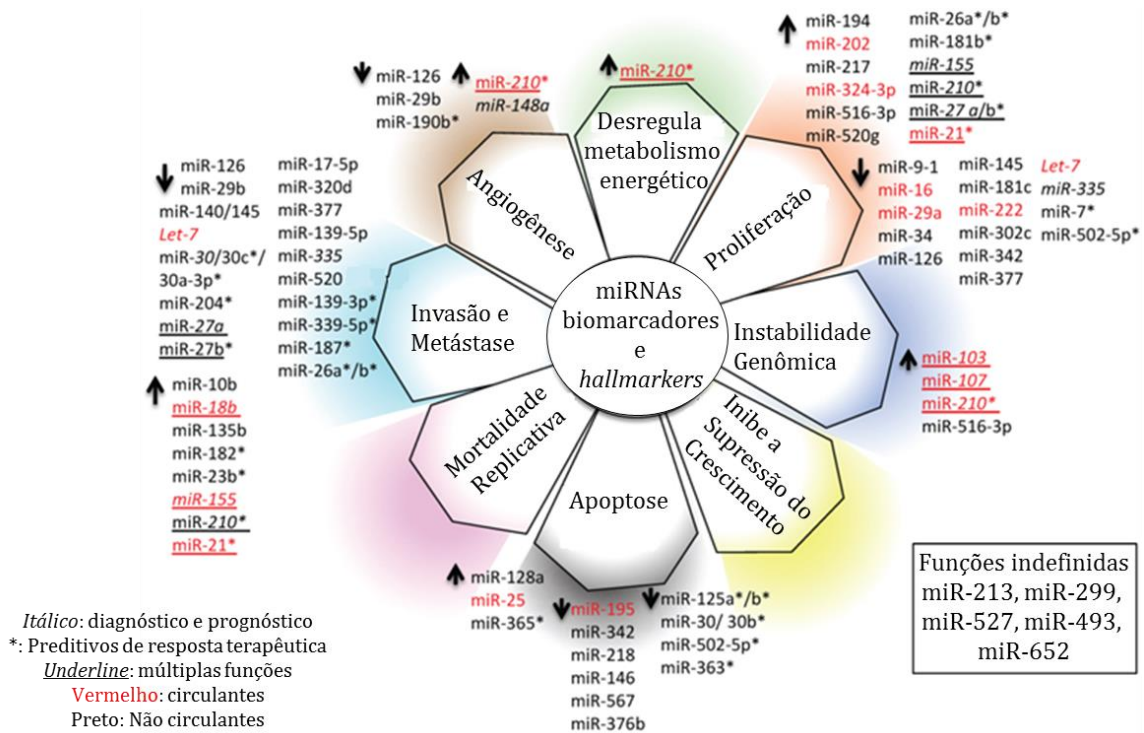
Figura 12. Hallmarks do câncer: nova geração. Há dez características que possibilitam disseminação, proliferação e sobrevivência das células tumorais. A resistência à morte celular e indução da angiogênese são alguns exemplos dessas características.



FONTE: Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Diante deste panorama, os miRNAs já foram identificados como reguladores dos *Hallmarks* do câncer, especialmente no que se refere ao câncer de mama, conforme revisão de Bertoli, Cava e Castiglioni (2015) (**Figura 13**).

Figura 13. MiRNAs identificados no câncer de mama. Foram identificados como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico (em itálico), preditivos de resposta terapêutica (*) e com múltiplas funções (underline), sendo que muitos deles ainda possuem funções indefinidas. Além disso, podem estar circulantes no plasma/soro (em vermelho) ou presentes nos tecidos (em preto).



FONTE: Adaptado de Bertoli, Cava e Castiglioni, 2015.

Por meio da técnica de *array*, estudos têm identificado diversos conjuntos de genes altamente expressos em tumores mamários e muitos possuem importante papel na angiogênese (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015). No processo angiogênico, os miRNAs atuam regulando a expressão de genes pela ligação aos seus potenciais alvos complementares, induzindo ou reduzindo a formação de novos vasos sanguíneos tumorais (ZHANG; LI; LAI, 2010). Assim, diversos miRNAs têm

tido descritos como promotores ou supressores da angiogênese (CORCORAN et al., 2011)

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o aumento de miRNAs promotores da angiogênese, induz a migração de células endoteliais (WANG; OLSON, 2009). Distintos miRNAs foram relacionados com a angiogênese em diferentes tipos tumorais. Estimulando o VEGF, o miR-10b e o miR-196b promoveu a angiogênese em células endoteliais de câncer de mama (PLUMMER et al., 2012). Em tecido endometrial o miR-200 suprimiu esse fator (CHUANG et al., 2012). Além disso, miR-125b e miR-199a apresentam propriedades anti-angiogênicas em câncer de ovário, suprimindo a angiogênese tumoral *in vitro* e *in vivo*, diminuindo a expressão da proteína HIF-1 α e os níveis de mRNA do VEGF (HE et al., 2013).

Nos últimos anos, estudos demonstram que os miRNAs não são apenas detectados nos tecidos, mas também no plasma, soro, saliva e urina (WEI et al., 2011; WIKLUND et al., 2011; SONG et al., 2012). Os miRNAs circulantes, que representam a população de miRNA na porção livre de células do sangue e fluidos corporais, atraíram interesse no campo da descoberta de biomarcadores por estarem envolvidos em diversos processos de regulação gênica (MITCHELL et al., 2008; ROTH et al., 2010). Além disso, a possibilidade de detectar os miRNAs circulantes no plasma ou soro de pacientes com câncer possibilita o uso deles como novos biomarcadores de diagnóstico minimamente invasivo, especialmente

porque essas moléculas apresentam estabilidade, já que estão livres da ação de RNases endógenas (SCHRAUDER et al., 2012; HUO et al., 2016; JURKOVICOVA et al., 2017).

8. MicroRNAs candidatos: miR-210 e miR-152

Neste estudo, foram selecionados dois miRNAs (miR-210 e miR-152) que estão envolvidos com o processo da angiogênese e estão presentes de forma livre na circulação sanguínea, para avaliar o potencial destes como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama.

8.1. MicroRNA-210

O miR-210 é considerado preferencialmente um miRNA oncogênico, que exibe a regulação mediada por HIF-1 α e VHL. HIF-1 α promove o aumento da expressão de miR-210 e este, leva a estabilização de HIF-1 α , sugerindo que ambos, miRNA e seu gene alvo estão envolvidos em um *positive feedback loop* (DANG; MYERS, 2015). Além disso, outro estudo forneceu suporte para demonstrar o envolvimento do miR-210 na regulação de hipóxia em diferentes linhagens celulares de câncer de mama, sugerindo regulação pelo miRNA transcricionalmente via HIF-1 α (CAMPS et al., 2008).

De acordo com a literatura, níveis elevados de miR-210 conduzem ao aumento da progressão tumoral, migração e redução da parada do ciclo

celular em células tumorais de mama MCF-7 (LIU et al., 2016). Zhang e colaboradores (2009) revelaram que altos níveis de miR-210 em células de carcinoma de cólon humano HCT116 levaram a uma maior expressão de c-Myc (gene envolvido na regulação da replicação do DNA e na transição das fases G0/G1) por meio da redução de MNT, um conhecido antagonista de c-Myc, responsável por prejudicar as funções proliferativas de c-Myc (ZHANG et al., 2009). Em concordância, Yang e colaboradores (2002) demonstraram que a baixa expressão de miR-210 em células de hepatocarcinoma induziram à parada do ciclo celular em fase G0/G1, resultando em diminuição da proliferação de células tumorais (YANG et al., 2012).

Atualmente, existe uma controvérsia no que se refere ao fato do miR-210 ser caracterizado como um oncogene ou supressor tumoral, no entanto, o motivo dessa aparente discrepância ainda é incerto. Tsuchiya e colaboradores (2010) observaram que a alta expressão de miR-210 em células de linhagens tumorais do esôfago humano CCEE e KYSE-10 induziu a parada do ciclo celular e conseqüentemente promoveu apoptose, demonstrando que este miRNA estaria atuando como supressor tumoral. Ainda, após ensaios funcionais, os autores relataram os efeitos supressores do miR-210 são mediados principalmente pelo seu alvo direto, o Receptor do Fator de Crescimento do Fibroblasto 1 (FGFRL1). Este receptor acelera a proliferação de células tumorais impedindo a parada do ciclo celular em G1/G0 (TSUCHIYA et al., 2011).

Como miRNA circulante, Madhavan e colaboradores (2016) analisaram a expressão de miRNAs em plasma de mulheres com câncer de mama metastático para avaliar a capacidade prognóstica desses pequenos RNAs. Além de encontrarem expressão plasmática do miR-210, os autores também concluíram que este foi associado ao aparecimento de metástase em até 2 anos após o diagnóstico de câncer de mama (MADHAVAN et al., 2016). Outro estudo também verificou expressão aumentada deste miRNA no soro de pacientes câncer de colo retal (WANG et al., 2016). Li e colaboradores (2017) também verificaram níveis aumentados do miR-210 em urina de pacientes com carcinoma renal em comparação com o grupo controle (LI et al., 2017).

8.2. MicroRNA-152

O miR-152 tem sido associado a processos de proliferação celular, invasão e angiogênese em diferentes neoplasias como mama (XU et al., 2013b), endométrio (HIROKI et al., 2010; TSURUTA et al., 2011), ovário (ZHOU et al., 2012) e colangiocarcinoma (BRACONI; HUANG; PATEL, 2010). Este miRNA faz parte da família miR-148/152, que é composta por miR-148a, miR-148b e miR-152, que possuem a mesma sequência inicial *seed* (CHEN; SONG; WANG, 2013). O miR-152 possui duas sequências maduras, o miR-152-5p e o miR-152-3p, sendo que o miR-152-3p está mais expresso em tumores (LIU et al., 2016). No câncer de mama, os níveis do

miR-152-3p estão diminuídos comparados aos tecidos mamários normais (XU et al., 2013).

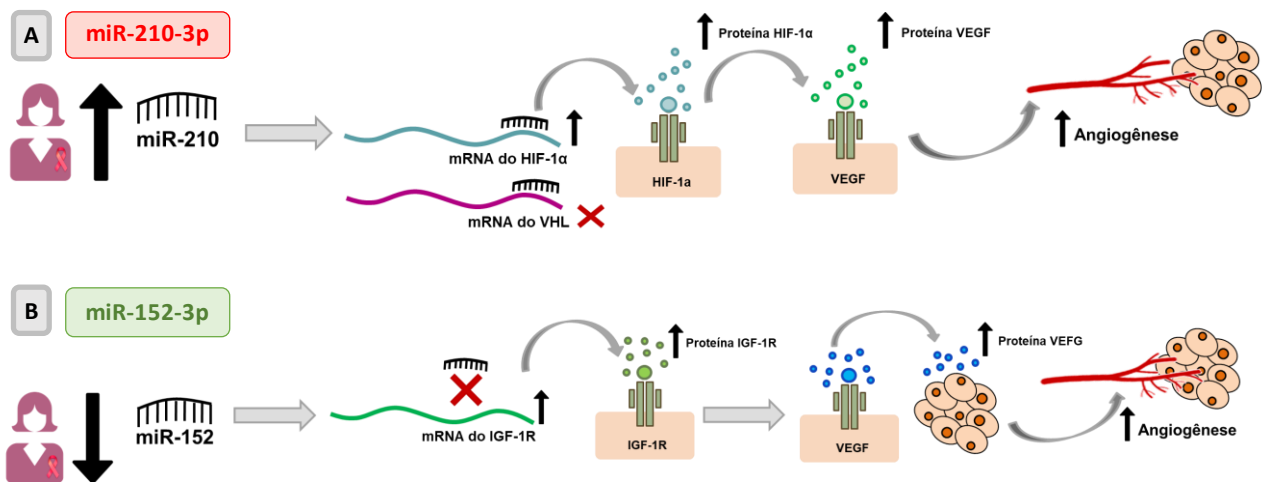
Estudos mostraram que a presença do miR-152 diminui a ação do VEGF, do VEGFR2 e do Fator de Transformação do Crescimento Beta 1 (TGF- β 1), contribuintes da angiogênese e também da proliferação celular (HAQUE et al., 2015). Em câncer de mama tendo como alvo o IGF-1R e o IRS1, induz à inibição de algumas vias de sinalização, culminando na inibição do HIF-1 α e do VEGF, fatores que promovem a síntese de novos vasos sanguíneos (XU et al., 2013; SENGUPTA et al., 2016).

Como miRNA circulante, Huang e colaboradores encontraram que o nível circulante de todos os três membros da família miRNA-148/152 foi significativamente menor nas amostras de plasma de pacientes com câncer de pulmão em comparação com os controles saudáveis (HUANG, 2016). No câncer de próstata, a expressão do miR-152 circulante foi significativamente menor no soro dos pacientes com câncer em comparação com os controles normais (CHEN et al., 2017).

Em resumo, a expressão do oncomiR-210 pode ser induzida por hipóxia e mediar a hipóxia induzida por metástase mediante o aumento da expressão de HIF-1 α . Ainda, o miR-210 pode inibir a degradação proteolítica de HIF-1 α pela repressão da proteína VHL. O HIF-1 α por sua vez, estimula outro fator pró-angiogênico, o VEGF (DEVLIN et al., 2011; QIN; FURONG; BAOSHENG, 2014; SHIDFAR et al., 2017). Com relação ao miR-152, estudos mostram que baixos níveis deste miRNA em tumores

resultam na inibição da degradação do IGF-1R, levando ao aumento de expressão de HIF-1 α , e conseqüentemente, de VEGF (XU et al., 2013b). Na progressão tumoral, a alta expressão do oncomiR-210 e a baixa expressão do supressor miR-152 vão desencadear no aumento do VEGF, proteína responsável pela formação de novos vasos sanguíneos (GERHARDT et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2005; MAAE et al., 2011) (Figura 14).

Figura 14. miR-210 (A) e miR-152 (B) atuando no processo da angiogênese. Aumentos dos níveis de expressão do miR-210 e diminuição dos níveis de expressão do miR-152 ativam vias que vão favorecer a neovascularização, processo importante para a progressão tumoral.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Objetivos

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O objetivo do deste estudo foi avaliar o potencial de dois miRNAs (miR-210 e miR-152) como biomarcadores diagnósticos não invasivos para o rastreamento e detecção precoce do câncer de mama, estudando suas correlações com variáveis prognósticas e esclarecendo o papel dos miRNAs na via de sinalização da angiogênese.

2. Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica do miR-210 e miR-152 em amostras de plasma e de fragmentos de pacientes com câncer de mama, alterações benignas da mama e grupo controle;
- Analisar a expressão das proteínas alvo (miR-210: HIF-1a e VHL; miR-152: IGF-1R e ambos: VEGF) nos mesmos grupos por imunohistoquímica.

Capítulos

III. CAPÍTULOS

1. RESULTADOS

Artigo

miR-210 and miR-152 and their targets proteins as biomarkers by liquid biopsy in Invasive Ductal Carcinoma

Beatriz Camargo Lopes^{1,2}, Fabrício Valiante Ventura², Jéssica Gisleine de Oliveira², Cristine Zampieri Braga², Edson Mitsuro Kato Junior², Newton Antonio Bordin Junior³, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2*}

Periódico: Scientific Reports

Resultados

miR-210 and miR-152 and their targets proteins as biomarkers by liquid biopsy in Invasive Ductal Carcinoma

Beatriz Camargo Lopes^{1,2}, Fabrício Valiante Ventura², Jéssica Gisleine de Oliveira², Cristine Zampieri Braga², Edson Mitsuro Kato Junior², Newton Antonio Bordin Junior³, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2*}

Beatriz Camargo Lopes^{1,2}

E-mail: beatrizclbio@gmail.com

Fabrício Valiante Ventura²

E-mail: ventura.bio.med@gmail.com

Jéssica Gisleine de Oliveira²

E-mail: jessicag.oliveira21@outlook.com

Newton Antonio Bordin Junior³

E-mail: bordinjunior@gmail.com

Cristine Zampieri Braga²

E-mail: cris_zamp@hotmail.com

Edson Mitsuro Kato Junior²

E-mail: edsonkato_jr@hotmail.com

Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2*}

E-mail: debora.zuccari@famerp.br

¹Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE), Cristovao Colombo, 2265, Jardim Nazareth, Sao Jose do Rio Preto (SP), Brazil, Zip code: 15054-000.

²Laboratorio de Investigaçao Molecular do Cancer (LIMC), Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (FAMERP), Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila Sao Pedro, Sao Jose do Rio Preto (SP), Brazil, Zip code: 15090-000.

³Hospital de Base de Sao Jose do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 - Vila Sao Pedro, São José do Rio Preto (SP) Zip code: 15090-000

* Corresponding author

Address correspondence to: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, PhD, Laboratorio de Investigaçao Molecular no Cancer (LIMC), Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). Avenue Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila Sao Pedro, CEP 15090-000, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brasil. Fax: +55-17-3201-5885. E-mail: debora.zuccari@famerp.br

Conflict of interest statement: No potential conflicts of interest.

ABSTRACT

The high mortality for breast cancer (BC) occurs mainly due to the late diagnosis, which can lead to angiogenesis and metastasis, and consequently, to a poor prognosis. The detection of circulating microRNAs (miRNAs) by liquid biopsy is of great importance for the determination of early diagnosis and prognosis in BC. Thus, the aim of this study was identify and validate microRNAs (miR-210 and miR-152) as non-invasive circulating biomarkers in the diagnosis and prognosis of BC patients and confirm their

performance in angiogenesis. For analysis of microRNAs expression was performed RT-qPCR in plasma and fragments of women with BC, benign breast and healthy. The immunohistochemistry was performed to analysis the expression of target proteins. Our results showed increased expression of oncomiR-210 and a decrease of suppressor miR-152 in tumor fragments. In the BC plasmas, both miRNAs were increased. Besides that, it was found that the HIF-1 α , IGF-1R and VEGF proteins showed increased expression in BC, while VHL showed decrease. We confirmed the oncogenic action of miR-210 and tumor suppression of miR-152 on BC fragments validated by their target proteins. The increased expression of these microRNAs in liquid biopsy of women with BC is promising in the diagnosis and prognosis of this neoplasm.

INTRODUCTION

Breast cancer is a worldwide concern due to its high incidence in the female population ¹. The high mortality rate for this neoplasm is mainly related to the development of metastasis. In order for neoplastic cells to migrate from the primary tumor and colonize other distant sites, there is a need for the recruitment of new blood vessels from pre-existing vessels, a process known as angiogenesis ^{2,3}. Data show that this malignant evolution is aggravated, in most cases, by the late diagnosis of the disease. Therefore, the identification of biomarkers that can diagnose early and predict the behavior of the tumor is of special interest to the patients ⁴.

Initially, angiogenic activity is not outstanding in neoplastic development. However, as the tumor grows, there is a reduction in oxygen at the center of the tumor, creating adverse conditions of hypoxia, which induce the increase of the expression of numerous pro-angiogenic factors, such as Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α) and Insulin-like Growth Factor type 1 Receptor (IGF-1R) ⁵. Increased levels of HIF-1 α and IGF-1R stimulate Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression, an

important protein for the synthesis of new blood vessels ⁶. On the other hand, anti-angiogenic factors, such as *Von Hippel Lindau* protein (VHL) acts in degradation of HIF-1 α and, consequently, decreases the expression of VEGF ⁷.

Currently, liquid biopsy has been gaining ground as a promising tool for the detection of neoplasms, with the benefit of being less invasive and causing minimal discomfort and risk to patients. This procedure consists of the collection of any bodily fluid for the purpose of analyzing information from the tumor, including circulating tumor cells (CTCs) ^{8,9} circulating nucleic acids (ctDNA and ctRNA) ^{10,11} and exosomes ^{12,13}. With the advancement of this technique, a growing series of researches has been developed for the purpose of discovering new circulating biomarkers that are more sensitive, characterizing specific subtypes of each tumor type ¹⁴.

Added to it, a class of small non-coding RNAs, called microRNAs (miRNAs; miRs), has been studied as potential biomarkers in cancer ¹⁵. MicroRNAs are small, non-coding endogenous RNAs with approximately 22 nucleotides that control numerous cell pathways through the regulation of gene expression in the post-transcriptional phase ¹⁶. In recent years, studies have shown that miRNAs are not only detected in tissues, but also in plasma ¹⁷, serum ¹⁸, saliva ¹⁹, and urine ²⁰.

The microRNAs (miRNAs) circulating, that represent the miRNA population in the free portion of body fluids, have attracted interest in the field of biomarker discovery because they are involved in several gene regulation processes ²¹. Among the circulating miRNAs in breast cancer, the miR-210 is considered an oncomiR because mediate metastasis-induced hypoxia by increasing of HIF-1 α and repression of VHL ^{22, 23}. Another miRNA involved with this scenario is the miR-152. Studies show that low levels of this miRNA in tumors result in inhibition of IGF-1R degradation, leading to increased expression of HIF-1 α , and consequently VEGF ^{24,25}. In summary, on tumor progression, the high expression of oncomiR-210 and

the low expression of the miR-152 suppressor will trigger off the increase in VEGF.

Therefore, it is of great importance for patients to validate tumor biomarkers that are capable of diagnosing and predicting the prognosis for breast cancer, and can still be detected by a noninvasive method such as liquid biopsy. The aim of this study was to validate two miRNAs involved in the angiogenic process, and to evaluate the potential of these as biomarkers of diagnosis and prognosis in breast cancer.

RESULTS

Characterization of study population

For Group I, the demographic characteristics analyzed were age, pathological prognosis staging, histological grade, distant metastasis and expression of hormonal receptors (ER, RP, HER2) (**Table 1**). Regarding age, among the 30 women included in this study, 25 (83.33%) had an age greater than or equal to 50 years, the mean age being 59 years (29 - 79 years). For the pathological prognosis staging, 14 samples (46.66%) were of the initial or intermediate stages (Ia, Ib, IIa and IIb) and 16 samples (53.34%) were of advanced stage. The histological grade of the tumor showed that 7 (23.33%), 20 (66.67%) and 3 (10%) samples were tumors that were well differentiated (Grade 3), moderately differentiated (Grade 2) and low differentiated (Grade 1), respectively. With regard to distant metastasis, this was found in 6 (20%) women until inclusion in this study. For the expression of hormone receptors, the data show that 22 (73.33%), 19 (63.33%) and 14 (46.67%) samples were positive for ER, PR and HER2, respectively. With respect to Group II (women with benign breast conditions), the mean age was 52 years (40 - 70 years). The diagnosis of each patient is listed in **Table 2**. Finally, the mean age of Group III (control group) was 49 years (23-70 years).

miR-210 and miR-152 as diagnostic biomarkers of breast cancer

Initially, we verified the expression of miR-210 and miR-152 in tumor fragments (Group I), benign (Group II) and normal (Group III) to test the diagnostic potential of these miRNAs in breast cancer. MiR-210 showed increased expression in tumor fragments of breast cancer compared to the control group (* $p < 0.05$) (**Figure 1-A**). For miR-152, relative quantification showed decrease expression in tumor fragments of breast cancer when compared to benign fragments and normal fragments (** $p < 0.01$) (**Figure 1-B**).

Subsequently, we verified the expression levels of these miRNAs in plasma samples for the three different groups. With respect to miR-210, the relative quantification showed increased plasma expression for women with breast cancer compared to the control group (** $p < 0.01$) (**Figure 2-A**). Surprisingly, we found that the tumor suppressor, miR-152, also had elevated levels in plasma samples from breast cancer patients compared to the control group (* $p < 0.05$), different from the tumor fragments (**Figure 2-B**). There was no significant difference in these miRs when compared to the breast cancer group and women with benign breast conditions.

miR-210 and miR-152 as prognostic biomarkers of breast cancer

After analyzing the potential of these miRNAs as breast cancer diagnostic biomarkers, we evaluated whether they could be significant as prognostic biomarkers. Prognostic analyzes (good prognosis of breast cancer *versus* poor prognosis of breast cancer) are represented in lines blues in the figures.

Our results show that miR-210 had increased expression in fragments of malignant neoplasms of poor prognosis when compared to samples of good prognostic fragments (** $p < 0.01$), which shows the potential of this miRNA as a prognostic biomarker in fragments. In addition, there was increased expression in malignant neoplasms of poor prognosis

when compared to samples of benign fragments (** $p < 0,01$) (**Figure 3-A**) Regarding miR-152, relative quantification showed decreased expression in malignant neoplasm fragments of poor prognosis in relation to the control group ($p < 0.05$). The difference was also significant among women with malignant neoplasm of good prognosis *versus* women with benign breast conditions ($p < 0.05$) and control women ($p < 0.05$) (**Figure 3-B**). However, there was no difference between the different prognoses of breast cancer for miR-152 in fragments.

For plasma samples, with respect to the miR-210, relative quantification showed increased expression in women with poor prognostic breast cancer in relation to women controls (** $p < 0.0001$) (**Figure 4-A**). However, there was no significant difference between the different prognoses of breast cancer. Surprisingly, in addition to the increased expression level of the tumor suppressor, miR-152, in plasma of women with breast cancer, this was also able to differentiate women from poor prognosis of women with good prognosis and control women (** $p < 0.05$), indicating the good potential of this miRNA as prognostic biomarker (**Figure 4-B**).

Expression of miRNA target proteins of by immunohistochemistry

To confirm the action of miR-210 and miR-152 on the angiogenesis pathway, we verified the expression of the target proteins of both miRNAs by immunohistochemistry. All proteins showed cytoplasmic marking. Evaluation of protein expression by immunohistochemistry revealed increased levels of HIF-1 α (** $p < 0.0001$), IGF-1R (** $p < 0.0001$) and VEGF (** $p < 0.0001$) proteins in breast cancer tissues compared to the control group. In addition, the proteins also showed increased expression in breast cancer samples compared to the benign group (Group II) (HIF-1 α ### $p < 0.0001$, IGF-1R ### $p < 0.0001$ and VEGF #### $p < 0.0001$). With respect to VHL, this protein showed decreased expression in breast cancer

samples when compared to the control group (** $p < 0.0001$) and benign group (### $p < 0.0001$) (**Figure 5**).

METHODS

Collection and Experimental Groups

Blood and tissue samples were collected at the Base Hospital of São José do Rio Preto, SP, Brazil, with the support of the Gynecology and Obstetrics Service team. In this study, three experimental groups were included:

- **Group I - BC (*Breast Cancer*)**: women with Breast Cancer (Plasma/Fragment: $n=30$);
- **Group II - BB (*Breast Benign*)**: women with Benign Breast Conditions (Plasma/Fragment: $n=5$);
- **Group III – BN (*Breast Normal*)** (Control): women with no breast atypical, and no history of breast cancer in the family (Plasma: $n=15$; Fragment: $n=5$).

With respect to Groups I and II, the fragments were obtained by core biopsy or mastectomy performed by the Mastology Service of the Base Hospital of São José do Rio Preto, São Paulo. For Group III, the mammary fragments were obtained in mammoplasty reduction collected by the Plastic Surgery team of the Base Hospital. It is worth mentioning that a sample of the corresponding plasma of the same women was also included in all the samples that were obtained (normal, benign or tumor). For women with breast cancer, blood was collected prior to any adjuvant and / or surgical treatment. This study was approved by the Research Ethics Committee and for all the women included in this study, the objectives, risks and benefits of this study were explained, and consent was obtained by the Informed Consent Form all signed by volunteers at the time of blood collection.

Determination of Diagnosis and Prognosis

The samples were collected from patients at their first appointment with the doctor and selected by the BI-RADS™ that indicated a higher probability of breast cancer (4C and 5). The classification of the prognosis for each patient was made one year after the diagnosis. To determine the prognosis of each patient, was used the most recent version (8th edition/2018) of breast cancer staging published by the American Joint Committee on Cancer (AJCC). The pathological prognostic staging of each patient were determined, analyzing characteristics such as anatomical profile of the tumor (TNM), histological grade and expression of biomarkers (ER, PR, HER2). Women with staging Ia, Ib, IIa and IIb (initial or intermediate cancer) were considered to have a good prognosis and women with staging IIIa, IIIb, IIIc and IV were considered to have a poor prognosis.

Analysis of miRNAs expression by RT-qPCR

Blood samples were collected by venipuncture (up to 5 mL per patient) and processed within one hour of collection. Plasma RNA extraction was performed with the miRNeasy Serum / Plasma kit (Qiagen®) (200 µL plasma) and the Trizol® reagent (Invitrogen Life Technologies®) was used for the fragments.

The cDNA was obtained by reverse transcriptase technique from the RNA extracted from the samples (50 ng). To obtain the cDNA, the TaqMan® MicroRNA Assays kit (Applied Biosystem®) was used. The Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) was performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem®). Reactions for miRNA expression analysis (and the reference gene - U6) were performed in triplicate (plasma) and duplicate (fragment) using 10 µL of 2 × TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL of 20 × TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems), 3 µL cDNA by volume, and 6 µL of H₂O DEPC, at a final of 20 µL. The relative expression values of the miRNAs of interest were determined by the quantification

method in relation to the mean of normalizing genes used as reference gene ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). Details of the miRNAs and their sequences are available in the **Supplementary Material**.

Analysis of the target protein expression by immunohistochemistry

The protein expression of the target genes HIF-1 α , IGF-1R, VHL and VEGF and was performed by immunohistochemistry assay, and their standardization followed the information provided by the manufacturer, establishing the dilution of 1:25 for HIF-1 α , 1:50 for IGF-1R, 1:200 for VHL and 1:300 for VEGF (**Supplementary Material**).

Histological sections of 4 μ m were obtained from paraffin embedded material and adhered to silanized slides. The deparaffinization of the xylol sections was carried out followed by hydration with decreasing ethanol. Posteriorly, the slides were incubated with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes and, after this, with the blocking of proteins (polymer) for 10 minutes. The material was incubated with the primary antibody of each specific protein for 18 hours at 4 ° C. After the incubation period, the slides were washed with saline (PBS). The Complement and HRP Conjugate (REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB-Spring Bioscience, Pleasanton, CA) were applied, followed by the chromogenic substrate (DAB) and Harris Hematoxylin. All immunoreactions were accompanied by a positive and negative control. The slides were observed under a 40 \times objective of the Olympus BX60 light equipment (Olympus, Japan) and analyzed by optical densitometry. For each sample, three different fields were photographed in the immunoreactive areas only, and IMAGE J® software was used to quantify the immunostained intensity.

Statistical analysis

The results were submitted to descriptive analysis to determine normality. The comparison of three (control, benign and cancer) or more (control, benign, good/poor prognosis) parameters was performed by the

Kruskall-Wallis test (posteriorly *Dunn Post test*). Data were presented as mean \pm Standard Error of Mean (SEM). Values of $p < 0.05$ were considered significant and all analyses were performed using Graphpad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

DISCUSSION

This study aimed to identify and validate two promising circulating miRNAs as biomarkers for diagnosis and prognosis of breast cancer. Our results showed increased miR-210 expression and decreased miR-152 in samples of tumor fragments. As for the plasma samples, we observed increased expression levels of miR-210 and, interestingly, also of miR-152. We also investigated the target proteins of these miRNAs involved in the angiogenesis pathway and found that the HIF-1 α , IGF-1R and VEGF showed increased expression by immunohistochemistry in breast cancer fragments. On the other hand, the VHL protein showed decreased expression in breast cancer.

It is known that high rates of breast cancer mortality are also related, in part, to the large heterogeneity of breast tumors among patients (intertumor heterogeneity)^{26,27}. In addition to the intertumoral complexity, breast cancer also presents high intratumoral heterogeneity (individual differences of each tumor). Adverse conditions in the tumor microenvironment, such as hypoxia, acidosis and oxidative stress may also exert selective pressure during tumor evolution, leading to "natural selection" within the microenvironment, creating subpopulations with selective advantage^{28,29}.

Thus, this series of factors involved in the complexity of breast cancer, a single sample obtained by biopsy or surgical resection provides spatially and temporally limited tumor information³⁰. Because of the greater ease of obtaining at any stage of the disease, liquid biopsy is a promising tool that has been gaining ground in personalized medicine. Circulating biomarkers are emerging as innovative biomarkers for the early detection of various

neoplasms, prediction of prognosis and monitoring of the effect of therapy³¹. These biomarkers have advantages over tissue biomarkers as they are easily obtained and can also be monitored routinely, resulting in real-time detection, and consequently effective diagnosis and prognosis³².

Many efforts have already been made to validate good biomarkers in breast cancer, and among them, carcinoma antigen 15.3 (CA 15.3) is the blood biomarker of breast cancer used in the current clinical routine. However, for patients in the early stages of the disease, it is able to detect only 23% of cases³³. Therefore, in the clinical routine, there is still no a useful biomarker that can detect early malignant tumors of the breast and predict the clinical evolution of the disease, besides having the benefit of being minimally invasive and able to be routinely quantified³⁴.

In addition to the benefits of liquid biopsy, studies show that miRNAs are stable in biological fluids and therefore have been investigated as potential circulating biomarkers^{17,35}. Thus, the well-consolidated miRNAs in breast cancer were selected to verify if they have good potential as circulating biomarkers. However, the action of these (oncomiR-210 and miR-152 tumor suppressor) on breast cancer was confirmed first.

Regarding breast cancer, miR-210 has been reported as one of the most consistent miRNAs for this neoplasm^{36,37}. In this study, the results showed increased expression levels of miR-210 in tumor fragment samples. In agreement with our results for tumor fragments, one study verified that miRNA expression was increased in the case group (benign breast samples that developed breast cancer within 1 year) in relation to the control group (benign breast samples that remained free of breast cancer to the time of inclusion in the study)²². Thakur et al. (2016) also observed increased expression of this miRNA in tissue and cell lines of breast cancer (MDA-MB-231 and MCF-10)³⁸. In addition, studies show that the overexpression of this miRNA in breast cancer is correlated with a poor prognosis, being associated with aggressiveness and distant metastases^{39,40}.

Subsequently, the oncomiR-210 target protein expressions involved in the angiogenesis pathway were validated. HIF-1 α promotes increased expression of miR-210 and this leads to stabilization of HIF-1 α , and consequently, an increase in VEGF levels ⁴¹. Furthermore, the VHL protein can act in this pathway through the proteolytic degradation of HIF-1 α ⁴².

In breast cancer samples, this study found increased levels of HIF-1 α expression and decreased levels of VHL. In agreement with these results, Gruber et al. (2004) also observed that HIF-1 α increased expression by immunohistochemistry in 56% of patients. In addition, they also observed that the up-regulation of HIF-1 α was related to a lower rate of free survival from distant metastases ⁴³. In neuroblastoma tumors, Ognibene et al. (2017) also observed that most hypoxic tumors present high expression of HIF-1 α , which is a prognostic indicator to stratify high-risk patients ⁴⁴. Another study showed that relatively strong HIF-1 α expression in pancreatic cancer tissues was related to increased invasion, greater tumor pathological stage and shorter survival time ⁴⁵.

Regarding the VHL protein, Zia et al. (2017) had already found decreased levels of VHL protein expression in breast cancer samples and the authors concluded that VHL, *in vitro*, exerts inhibitory effects on the invasive and migratory capacity of cancer cells ⁴⁶. Furthermore, in renal carcinoma cells, densitometry analysis revealed that the protein expression of VHL in cancerous tissue was lower when compared to normal adjacent tissue of the patients ⁴⁷.

Another miRNA addressed in this study was miR-152. This is considered a tumor suppressor miRNA well validated in several types of neoplasms, including breast cancer ^{24,48}. In this study, decreased levels of miR-152 expression were observed in tumor fragments. In addition to these results, Wen et al. (2017) found that miR-152 expression levels were significantly lower in breast cancer fragments than in non-cancerous tissues ⁴⁹. Furthermore, Ge et al. (2017) investigated the role of this miRNA in the initiation and progression of breast cancer and found that miR-152

expression was significantly reduced in breast cancer fragments and in cell lines ⁵⁰.

MiR-152 acts on the angiogenesis pathway as a tumor suppressor leading to IGF-1R blockade ²⁴. According to the literature, binding of insulin-like growth factor (IGF-1) to IGF-1R activates the PI3K / AKT cascade via the mTOR pathway, inducing the expression of HIF-1 α and VEGF (CHIU et al., 2011). In the validation step, the results showed higher levels of IGF-1R expression by immunohistochemistry in breast cancer samples. In agreement with our findings, studies have observed the overexpression of IGF-1R in breast cancer samples, and may influence the heterogeneity of molecular subtypes ⁵¹. In lung cancer, authors demonstrated that elevated IGF-1R levels were related to increased resistance to the drug gefitinib (EGFR inhibitor drug) ⁵².

Both cascades of miR-210 and miR-152 have a final interference on the VEGF protein, which will culminate in the development of new blood vessels for the tumor microenvironment ⁵³. In this study, the expression of VEGF in breast cancer samples was validated. As with the results of this study, previous studies have shown an increase of this protein in breast cancer and also in other neoplasms ⁵⁴⁻⁵⁷.

After verifying the expression of these miRNAs and their target proteins in breast cancer tumor fragments, we questioned whether they could be potential circulating biomarkers for this neoplasm.

The results of this study show that miR-210 levels were increased in plasma samples from women with breast cancer. In agreement with these results, Madhavan et al. (2016) observed that miR 210 presented high levels in plasma samples from women with breast cancer, and its expression was associated with the appearance of metastasis for up to 2 years after confirmation of the diagnosis ⁵⁸. Markou et al. (2016) also found significantly elevated plasma miR-210 levels in women with metastatic breast cancer compared to healthy women ⁵⁹.

The results showed increased expression of circulating miR-152 in the plasma of women with breast cancer. This was an interesting finding in this study because, as already described, miR-152 has a suppressive action on fragments of breast neoplasms. In the literature, there is only one study involving the miR-152 and blood samples from patients with breast cancer. The authors also observed increased plasma levels of miR-152 in patients with the disease and in patients with benign lesions compared to the control group. Similarly, this observation of increased plasma expression of miR-152 in several cancer patients was unexpected for the authors, because miR-152 is considered downregulated in tumor fragments ⁶⁰. However, in lung ⁶¹, prostate ⁶² and ovarian cancer ⁶³ circulating levels of miR-152 was downregulated compared to the non-cancerous group.

Much speculation has emerged in recent years over the mechanisms that lead to increased levels of circulating miRNAs. It is believed that miRNAs from tumors and released into the bloodstream are resistant to ribonucleases because they are packaged in excretory microvesicles (eg, exosomes), but little is known about how and why such changes would occur in the level of circulating miRNAs ^{64,65}. It is believed that cell lysis or increased numbers of exosomes ruptured in cancer cells contribute to elevated levels of miRNAs in the blood ^{66,67}.

Further studies should be performed to understand the mechanisms that lead to the increase of miRNAs in the blood, including tumor suppressors. Despite the increase in miR152 suppressor in plasma, the results show that it was able to diagnose and differentiate the prognosis in women with breast cancer. Thus, the two miRNAs have good potential as biomarkers by liquid biopsy.

CONCLUSION

In conclusion, this study detected increased levels of miR-210 and miR-152 in women with breast cancer by liquid biopsy. Among miRNAs, miR-152, besides presenting potential as a diagnostic biomarker, it is a

potential prognostic biomarker. Analysis of microRNA expression in the fragments showed increased miR-210 and decreased miR-152 in breast cancer, also validated by the expression of their target proteins involved in angiogenesis.

These results may contribute to the use of these two promising circulating markers in the early diagnosis and prognosis of breast cancer patients, in addition to the benefit of being detected by liquid biopsy. In the future, it is also expected that these miRNAs may be potential therapeutic targets, contributing to advances in personalized medicine.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Funded by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo - FAPESP/Brazil (grants 2017/11807-3), Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundaçao de Apoio a Pesquisa e Extensao de Rio Preto (FAPERP) supporting fellowship. Thanks to the Laboratory of Morphology and Microanalysis (LMM) of the Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences (IBILCE / UNESP) – SP/Brazil with the support to obtain the photomicrographs. Finally, thanks to all patients and to the team of doctors, nurses and technicians of the Base Hospital of São José do Rio Preto.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

B.C.L. performed the sample collection and all real-time PCR experiments. F.V.V., C.Z.B and E.M.K. performed immunohistochemistry. J.G.O contributed to data analysis. N.A.B. contributed to the collection of samples. D.A.P.C.Z. supervised the studies, contributing to a data analysis and manuscript writing.

REFERENCES

1. GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. (2018). Available at: <http://gco.iarc.fr/>. (Accessed: 20th January 2019)
2. Crawford, Y. & Ferrara, N. VEGF inhibition: Insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res.* **335**, 261–269 (2009). doi: 10.1007/s00441-008-0675-8
3. McGuire, A., Brown, J. A. L. & Kerin, M. J. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 145–155 (2015).doi: 10.1007/s10555-015-9551-7
4. Zhang, C. et al. MiR-21: A gene of dual regulation in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **48**, 161–172 (2016). doi: 10.3892/ijo.2015.3232
5. Boudreau, N. & Myers, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* **5**, 140–146 (2003). doi: 10.1186/bcr589
6. Chiu, C. J. et al. Associations between genetic polymorphisms of insulin-like growth factor axis genes and risk for age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9099–9107 (2011). doi: 10.1167/iovs.11-7782
7. Rahimi, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 538–548 (2012). doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0555
8. Aarthy, R., Mani, S., Velusami, S., Sundarsingh, S. & Rajkumar, T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol. Diagnosis Ther.* **19**, 339–350 (2015). doi: 10.1007/s40291-015-0167-y
9. Wu, F.-T., Lu, L., Xu, W. & Li, J.-Y. Circulating tumor DNA: clinical roles in diffuse large B cell lymphoma. *Ann. Hematol.* **98**, 255-269 (2018). doi:10.1007/s00277-018-3529-9
10. Wan, J. C. M. et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 1–16 (2017). doi: 10.1038/nrc.2017.7
11. Yoshioka, Y., Katsuda, T. & Ochiya, T. Extracellular vesicles and encapsulated miRNAs as emerging cancer biomarkers for novel liquid biopsy. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **48**, 869-876 (2018). doi:10.1093/jjco/hyy120
12. Becker, A. et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell* **30**, 836–848 (2016). doi: 10.1016/j.ccell.2016.10.009.

13. Kalishwaralal, K., Kwon, W. Y. & Park, K. S. Exosomes for non-invasive cancer monitoring. *Biotechnol. J.* (2018). doi: 10.1002/biot.201800430
14. Alves, G. & Delmonico, L. O presente e o futuro dos marcadores circulantes de câncer. *HUPE*. **14**, 66–72 (2015).
15. Guo, X. et al. Five microRNAs in serum as potential biomarkers for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention. *Int. Urol. Nephrol.* (2018). doi: 10.1007/s11255-018-2009-4
16. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269 (2006). doi: 10.1038/nrc1840
17. Wei, J. et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin. J. Cancer* **30**, 407–414 (2011). doi: 10.5732/cjc.010.10522
18. Asaga, S. et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin. Chem.* **57**, 84–91 (2011). doi: 10.1373/clinchem.2010.151845
19. Adéla, K. & Ondřej, S. Use of Salivary MicroRNAs for Diagnosis of Solid Cancers. *Klin Onkol.* **31**, 349–359 (2018). doi: 10.14735/amko2018249
20. Li, G., Zhao, A., Péoch, M., Cottier, M. & Mottet, N. Detection of urinary cell-free miR-210 as a potential tool of liquid biopsy for clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **35**, 294–299 (2017). doi: 10.1016/j.urolonc.2016.12.007
21. Roth, C. et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, 2–8 (2010). doi: 10.1186/bcr2766
22. Shidfar, A. et al. Expression of miR-18a and miR-210 in Normal Breast Tissue as Candidate Biomarkers of Breast Cancer Risk. *Cancer Prev. Res.* **10**, 89–97 (2017). doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0177
23. Dang, K. & Myers, K. A. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 6353–6372 (2015). doi: 10.3390/ijms16036353
24. Xu, Q. et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 3–13 (2013). doi: 10.1093/jmcb/mjs049
25. Liu, X., Li, J., Qin, F. & Dai, S. MiR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncol. Lett.* **11**, 3911–3916 (2016). doi: 10.3892/ol.2016.4509

26. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011). doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003.
27. Song, J. L., Chen, C., Yuan, J. P. & Sun, S. R. Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. *Cancer Med.* **5**, 3475–3488 (2016). doi:10.1002/cam4.943
28. Ansell, S. M. & Vonderheide, R. H. Cellular Composition of the Tumor Microenvironment. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* 91–97 (2013). doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.e91
29. Khramtsov, V. V. & Gillies, R. J. Janus-Faced Tumor Microenvironment and Redox. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 723–729 (2014). doi: 10.1089/ars.2014.5864.
30. Ilić, M. & Hofman, P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl. Lung Cancer Res.* **5**, 420–423 (2016). doi: 10.21037/tlcr.2016.08.06
31. Wang, Y. et al. Downregulated circulating microRNAs after surgery: potential noninvasive biomarkers for diagnosis and prognosis of early breast cancer. *Cell Death Discov.* (2018). doi: 10.1038/s41420-018-0089-7
32. Qi, Z. H. et al. The significance of liquid biopsy in pancreatic cancer. *J. Cancer* **9**, 3417–3426 (2018). doi: 10.7150/jca.24591
33. Duffy, M. J., Evoy, D. & McDermott, E. W. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1869–1874 (2010). doi: 10.1016/j.cca.2010.08.039
34. Duffy, M. J. et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur. J. Cancer* **75**, 284–298 (2017). doi: 10.1016/j.ejca.2017.01.017
35. Song, J. et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 897–904 (2012). doi: 10.1007/s10620-011-1981-7
36. Hong, L., Han, Y., Zhang, H., Zhao, Q. & Qiao, Y. miR-210: a therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 21–28 (2013). doi: 10.1517/14728222.2012.732066.
37. Qin, Q., Furong, W. & Baosheng, L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *J. Exp. Clin. cancer Res.* **33**, 2–10 (2014). doi: 10.1186/1756-9966-33-50
38. Thakur, S., Grover, R. K., Gupta, S., Yadav, A. K. & Das, B. C. Identification of Specific miRNA Signature in Paired Sera and Tissue

- Samples of Indian Women with Triple Negative Breast Cancer. *PLoS One* **11**, 1–21 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0158946
39. Bar, I. et al. The MicroRNA miR-210 Is Expressed by Cancer Cells but Also by the Tumor Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **65**, 335–346 (2017). doi: 10.1369/0022155417702849
40. Toyama, T. et al. High Expression of MicroRNA-210 is an Independent Factor Indicating a Poor Prognosis in Japanese Triple-negative Breast Cancer Patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **42**, 256–263 (2012). doi: 10.1093/jjco/hys001
41. Zhang, Y. et al. HIF-1 α Promotes Breast Cancer Cell MCF-7 Proliferation and Invasion Through Regulating miR-210. *Cancer Biother. Radiopharm.* **32**, 297–301 (2017). doi: 10.1089/cbr.2017.2270.
42. Kong, W. et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* **33**, 679–89 (2014). doi: 10.1038/onc.2012.636.
43. Gruber, G. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: An independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res.* **6**, 191–198 (2004). doi: 10.1186/bcr775
44. Ognibene, M. et al. Immunohistochemical analysis of PDK1, PHD3 and HIF-1 α expression defines the hypoxic status of neuroblastoma tumors. *PLoS One* **12**, 1–19 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0187206
45. Wang, M., Chen, M., Guo, X. & Jiang, J. Expression and significance of HIF-1 α and HIF-2 α in pancreatic cancer. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* **35**, 874–879 (2015). doi: 10.1007/s11596-015-1521-3
46. Zia, M. K., Rmali, K. A., Watkins, G., Mansel, R. E. & Jiang, W. E. N. G. The expression of the von Hippel-Lindau gene product and its impact on invasiveness of human breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 605–611 (2007). doi: 10.3892/ijmm.20.4.605
47. Högner, A. et al. PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **36**, 1-14(2018). doi: 10.1016/j.urolonc.2017.10.027
48. Zhang, H., Lu, Y., Wang, S., Sheng, X. & Zhang, S. MicroRNA-152 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting angiogenesis-related growth factors in human gastric cancer. *Gastric Cancer* **21**, 41–54 (2017). doi:10.1007/s10120-017-0721-x

49. Wen, Y. Y. et al. IGF-1-mediated PKM2/ β -catenin/miR-152 regulatory circuit in breast cancer. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-15607-y
50. Ge, S., Wang, D., Kong, Q., Gao, W. & Sun, J. Function of miR-152 as a Tumor Suppressor in Human Breast Cancer by Targeting PIK3CA. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* **25**, 1363–1371 (2017). doi: 10.3727/096504017X14878536973557
51. Sun, W. et al. Insulin-like growth factor 1 receptor expression in breast cancer tissue and mammographic density. *Mol. Clin. Oncol.* **3**, 572–580 (2015). doi: 10.3892/mco.2015.497
52. Peled, N. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a biomarker for resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer. *Cell. Oncol.* **36**, 277–288 (2013). doi: 10.1007/s13402-013-0133-9
53. Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A. & Ballmer-Hofer, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 601–615 (2006). doi: 10.1007/s00018-005-5426-3
54. Maae, E. et al. Estimation of immunohistochemical expression of VEGF in ductal carcinomas of the breast. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 750–760 (2011). doi: 10.1369/0022155411412599
55. Zang, J. et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer: A meta-analysis. *Head Neck* **35**, 1507–1514 (2012). doi: 10.1002/hed.23156.
56. Alevizakos, M., Kaltsas, S. & Syrigos, K. N. The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 1169–1181 (2013). doi: 10.1007/s00280-013-2298-3
57. Wen, S. et al. Apatinib regulates the cell proliferation and apoptosis of liver cancer by regulation of VEGFR2/STAT3 signaling. *Pathol. Res. Pract.* 1-6 (2019). doi:10.1016/j.prp.2019.01.021
58. Madhavan, D., Cuk, K., Burwinkel, B. & Yang, R. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. *Front. Genet.* **4**, 1-13 (2013). doi: 10.3389/fgene.2013.00116
59. Markou, A. et al. Direct comparison of metastasis-related miRNAs expression levels in circulating tumor cells, corresponding plasma, and primary tumors of breast cancer patients. *Clin. Chem.* **62**, 1002–1011 (2016). doi: 10.1373/clinchem.2015.253716

60. Chen, H. et al. Evaluation of plasma miR-21 and miR-152 as diagnostic biomarkers for common types of human cancers. *J. Cancer* **7**, 490–499 (2016).
61. Dou, H., Wang, Y., Su, G. & Zhao, S. Decreased plasma let-7c and miR-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 9291–9298 (2015).
62. Matin, F. et al. A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-24424-w
63. Langhe, R. et al. A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. *Cancer Lett.* **356**, 628–636 (2015). doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.010
64. Komatsu, S. et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma? *Br. J. Cancer* **105**, 104–111 (2011). doi: 10.1038/bjc.2013.148
65. Pegtel, D. M. et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 6328–6333 (2010). doi: 10.1073/pnas.0914843107
66. Falcone, G., Felsani, A. & D'Agnano, I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 1–10 (2015). doi: 10.1186/s13046-015-0148-3
67. Cheng, G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **81**, 1–19 (2014). doi: 10.1016/j.addr.2014.09.001

TABLE/FIGURE LEGENDS

Table 1. Demographic characteristics of breast cancer patients.

Table 2. Group II Diagnostics. Women with benign breast conditions included in this study and their respective diagnoses.

Figure 1. Evaluation of miRNA expression in fragments as diagnostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification

showed that miR-210 exhibited increased expression in samples of tumor fragments from patients with breast cancer *versus* benign breast conditions; (B) Gene expression of miR-152. Contrastingly, miR-152 showed decreased expression in samples of breast cancer fragments compared to the control group and to the group of benign breast conditions. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 2. Evaluation of plasma miRNA expression as diagnostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification revealed that miR-210 showed increased expression in plasma samples from breast cancer patients *versus* the control group; (B) Gene expression of miR-152. The miR-152 also showed increased expression in plasma samples from women with breast cancer *versus* the control group. No significant difference was observed between the breast cancer group and benign breast conditions for any miRNA. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 3. Evaluation of miRNA expression in fragments as prognostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification showed that there was increased expression of miR-210 in samples of breast cancer fragments with poor prognosis when compared to women with good prognosis (*blue lines*). Besides that, the increase was also significant with benign breast conditions; (B) Gene expression of miR-152. There was no significant difference between the prognostic groups. miR-152 showed a significant decrease of expression in fragments from women with poor prognosis *versus* the control group and also decreased expression in malignant neoplasms of good prognosis when compared to women with benign breast conditions and the control group. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 4. Evaluation of plasma miRNA expression as prognostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification showed that there was increased expression of miR-210 in plasma samples from women with malignant neoplasms of good prognosis *versus* women with benign breast conditions and controls; (B) Expression of miR-152. With regard to miR-152, this showed increased expression in plasma samples from women with malignant neoplasms of poor prognosis *versus* women with malignant neoplasms of good prognosis (*blue lines*) and controls. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

Figure 5. Target Proteins expression by immunohistochemistry. (A) Normal breast (Control); (B) Benign Breast Conditions; (C) Breast Cancer; (D) Evaluation of protein expression in the three different groups. HIF-1 α , IGF-1R and VEGF showed a significant increase in the breast cancer group compared to the group with benign breast conditions and the control group. Differently, VHL showed a significant decrease in the breast cancer group compared to the group with benign breast conditions and the control group. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. *** $p < 0.0001$ vs. control group; ### $p < 0.0001$ vs. benign group). Magnification of 40X. Bar: 20 μ m

TABLES AND FIGURES

TABLES

Table 1. Demographic characteristics of breast cancer patients.

Variable	N (%)
TNM staging	
Initial or intermediate stage (Ia, Ib, IIa, IIIb)	14 (46,66%)
Advanced stage (IIIa, IIIb, IIIc and IV)	16 (53,34%)
Histological Grade	
Grade I	3 (10%)
Grade II	20 (66,67%)
Grade III	7 (23,33%)
Distant metastasis	
Yes	6 (20%)
No	24 (80%)
ER	
Yes	22 (73,33%)
No	8 (26,67%)
PR	
Yes	19 (63,33%)
No	11 (36,67%)
HER2	
Yes	14 (46,67%)
No	16 (53,33%)

Table 2. Group II Diagnostics. Women with benign breast conditions included in this study and their respective diagnoses.

Group II	Diagnosis
BB-1	Fibroadenoma
BB-2	Fibroadenoma
BB-3	Fibroadenoma
BB-4	Stromal sclerosis with dystrophic calcification
BB-5	Ductal hyperplasia

FIGURES

Figure 1. Evaluation of miRNA expression in fragments as diagnostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification showed that miR-210 exhibited increased expression in samples of tumor fragments from patients with breast cancer *versus* benign breast conditions; (B) Gene expression of miR-152. Contrastingly, miR-152 showed decreased expression in samples of breast cancer fragments compared to the control group and to the group of benign breast conditions. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

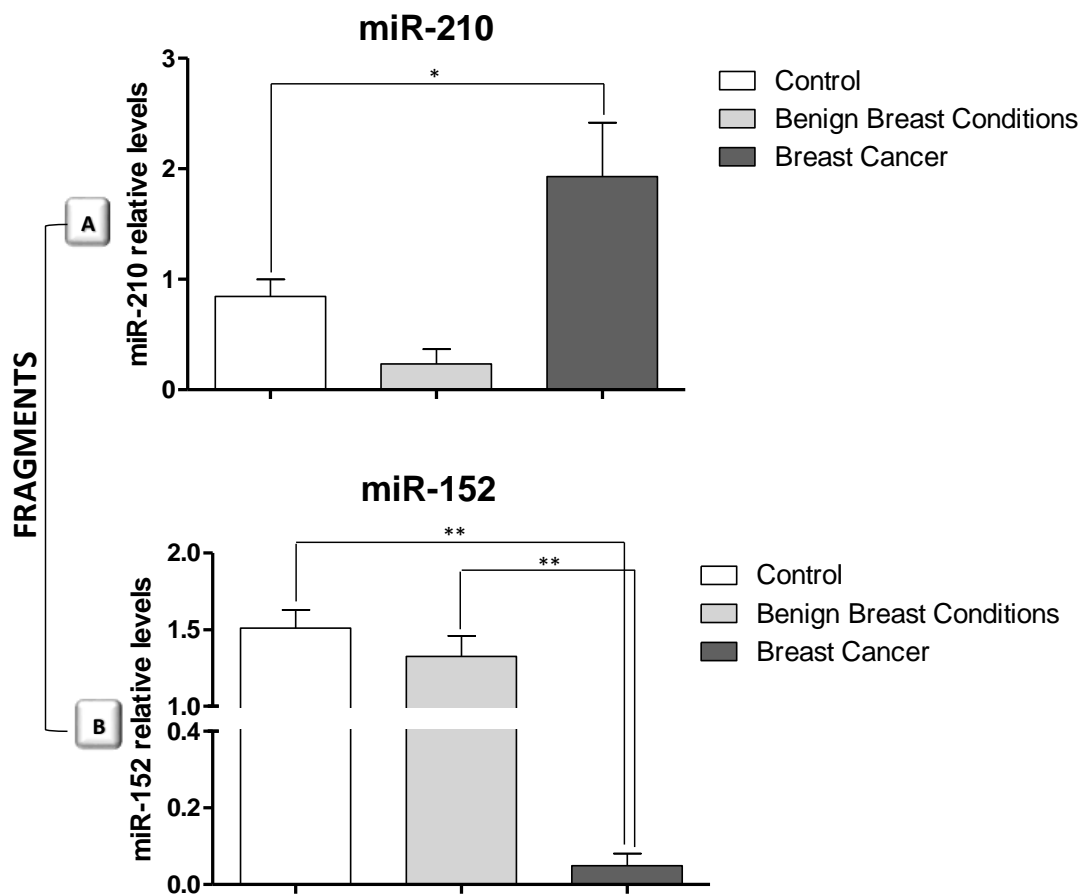


Figure 2. Evaluation of plasma miRNA expression as diagnostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification revealed that miR-210 showed increased expression in plasma samples from breast cancer patients *versus* the control group; (B) Gene expression of miR-152. The miR-152 also showed increased expression in plasma samples from women with breast cancer *versus* the control group. No significant difference was observed between the breast cancer group and benign breast conditions for any miRNA. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

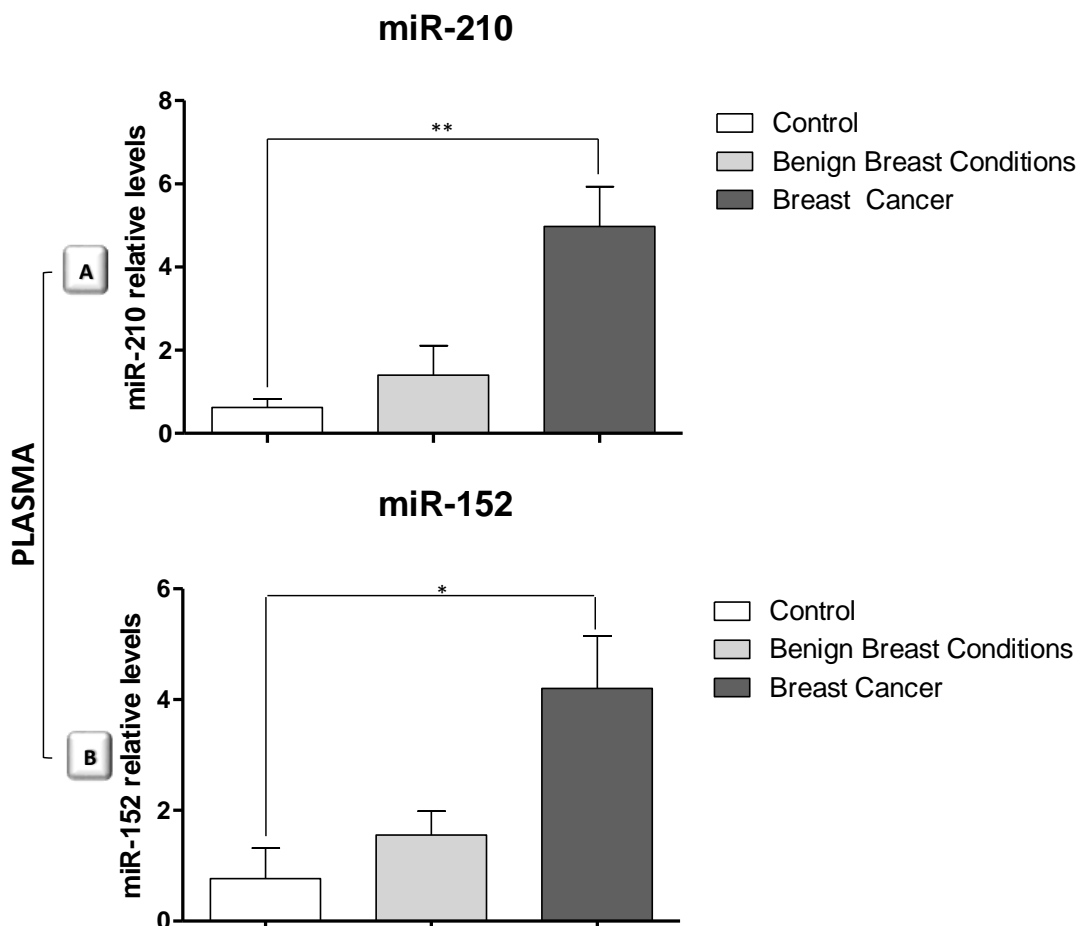


Figure 3. Evaluation of miRNA expression in fragments as prognostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification showed that there was increased expression of miR-210 in samples of breast cancer fragments with poor prognosis when compared to women with good prognosis (*blue lines*). Besides that, the increase was also significant with benign breast conditions; **(B)** Gene expression of miR-152. There was no significant difference between the prognostic groups. miR-152 showed a significant decrease of expression in fragments from women with poor prognosis *versus* the control group and also decreased expression in malignant neoplasms of good prognosis when compared to women with benign breast conditions and the control group. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

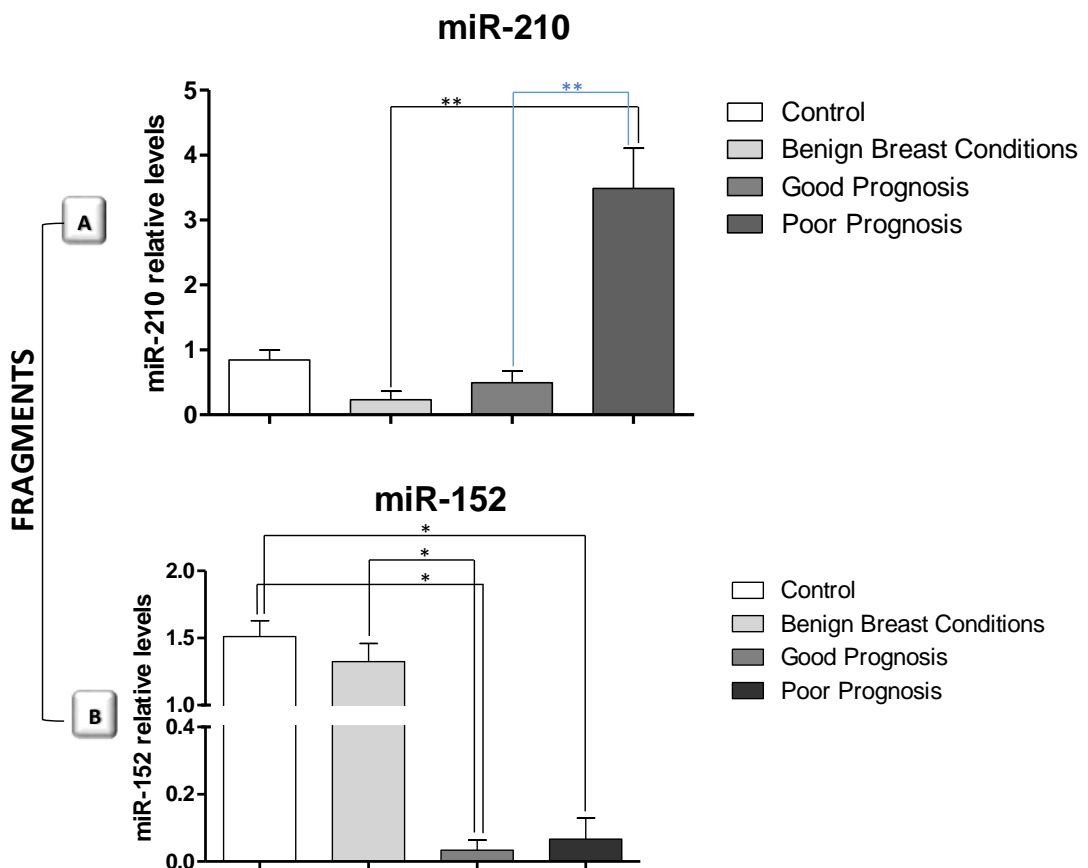


Figure 4. Evaluation of plasma miRNA expression as prognostic biomarkers. (A) Gene expression of miR-210. Relative quantification showed that there was increased expression of miR-210 in plasma samples from women with malignant neoplasms of good prognosis *versus* women with benign breast conditions and controls; (B) Expression of miR-152. With regard to miR-152, this showed increased expression in plasma samples from women with malignant neoplasms of poor prognosis *versus* women with malignant neoplasms of good prognosis (*blue lines*) and controls. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

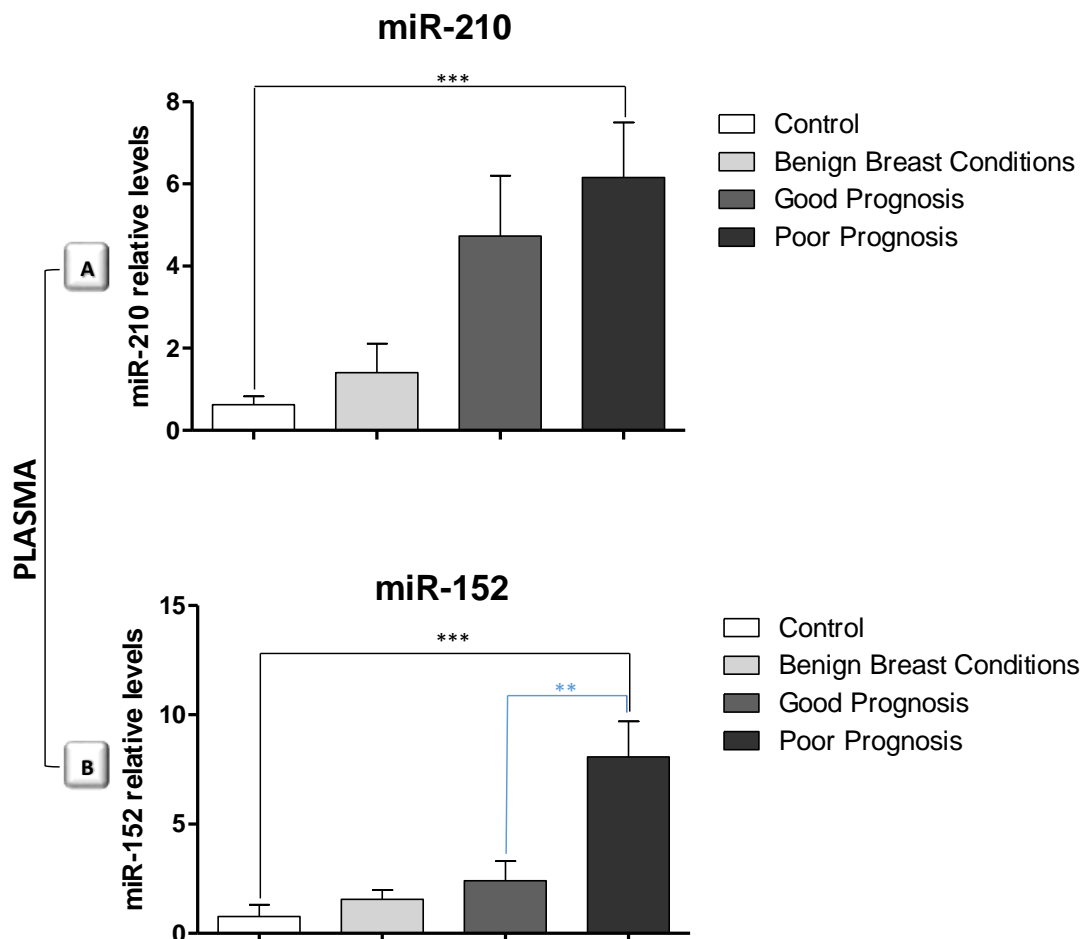
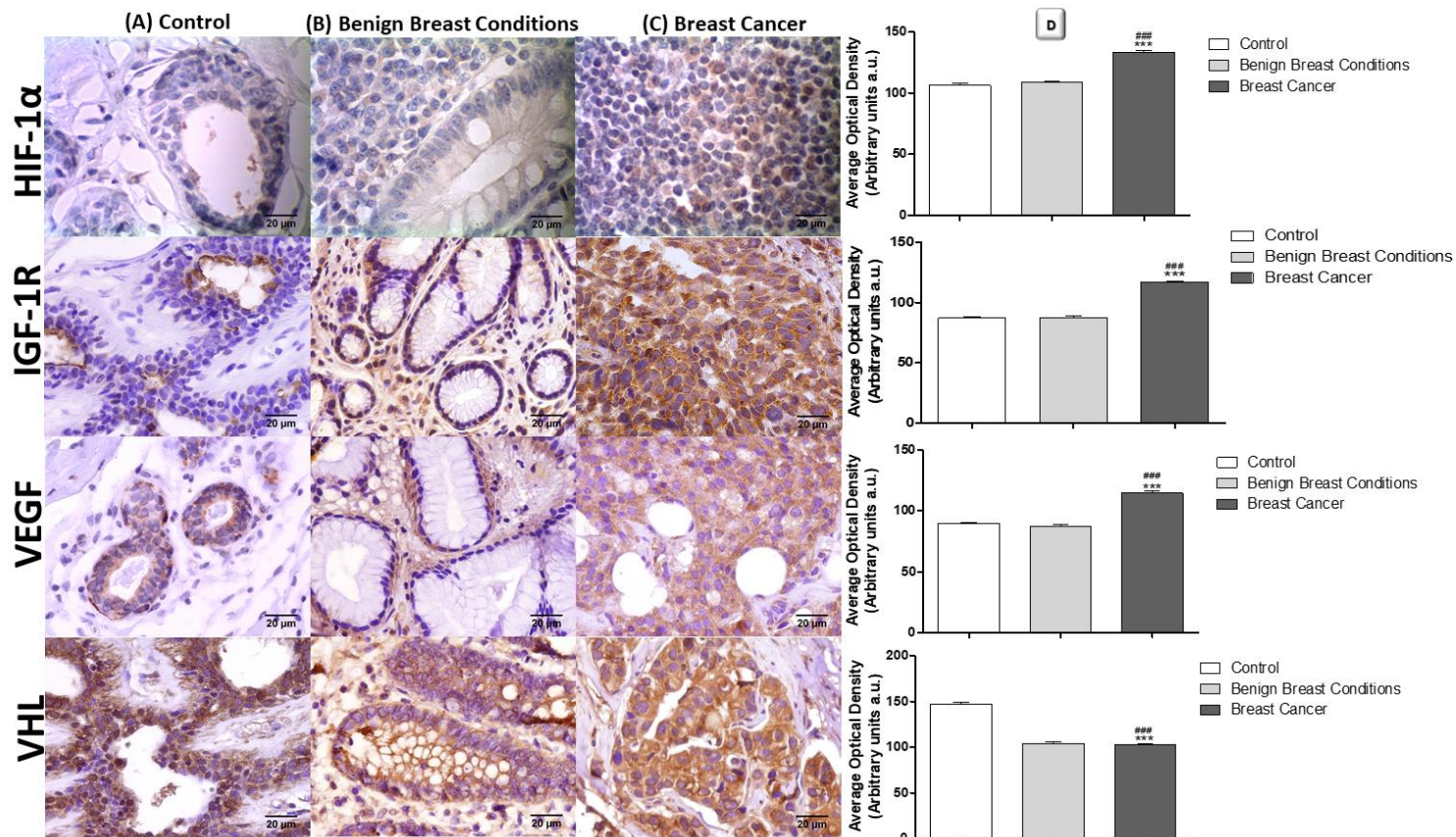


Figure 5. Target Proteins expression by immunohistochemistry. (A) Normal breast (Control); (B) Benign Breast Conditions; (C) Breast Cancer; (D) Evaluation of protein expression in the three different groups. HIF-1 α , IGF-1R and VEGF showed a significant increase in the breast cancer group compared to the group with benign breast conditions and the control group. Differently, VHL showed a significant decrease in the breast cancer group compared to the group with benign breast conditions and the control group. Significant value in Kruskal-Wallis and Dunn's post test (\pm S.E.M. ***p < 0.0001 vs. control group; ###p < 0.0001 vs. benign group). Magnification of 40X. Bar: 20 μ m



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Description of microRNAs

miR-210-3p	
Chromosome Location	Chr.11 - 568112-568171 [-] on UCSC Ensembl
Mature miRNA Sequence	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
Stem Loop	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCCUGC CCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCCACUGUGCG UGUGACAGCGGCUGAUCUGUGCCUGGGCAGCGCG ACCC

miR-152-3p	
Chromosome Location	Chr. 17 - 48037161 - 48037247 [-] on Build GRCh38
Mature miRNA Sequence	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
Stem Loop	UGUCCCCCCCCGGCCAGGUUCUGUGAUACACUCCG ACUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAAC UUGGGCCCGGAAGGACC

SOURCE: miRBase (<http://www.mirbase.org>).

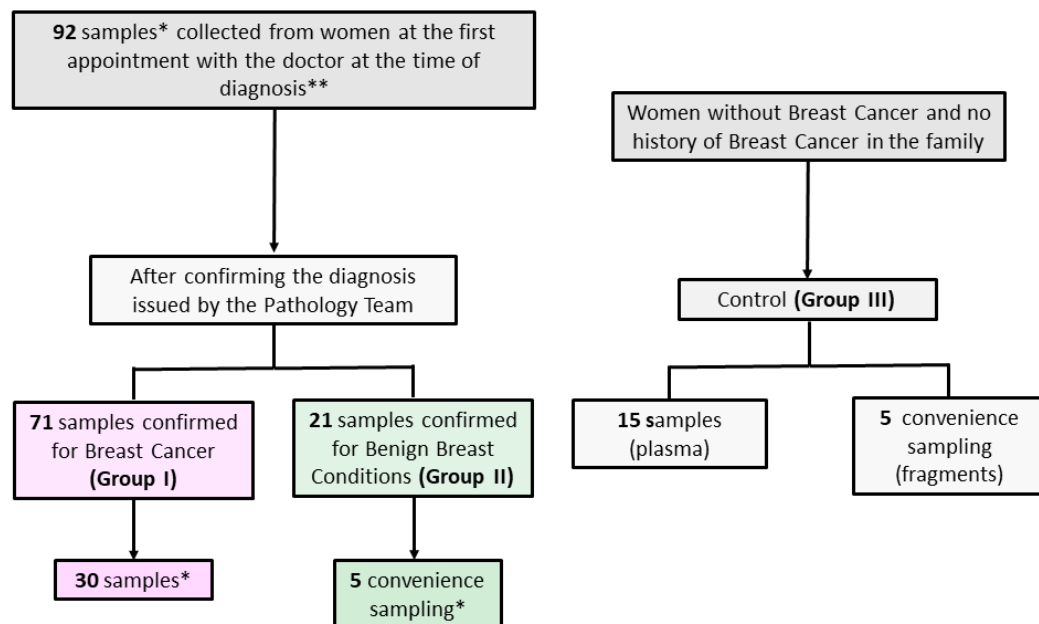
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Primary antibodies used in immunohistochemical techniques and their respective specifications.

Antibody	Company	Clone	Dilution IHC	Marking
HIF-1 α	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	H1alpha67	1:25	Cytoplasmatic
IGF-1R	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C-terminal	1:50	Cytoplasmatic
VHL	ABCAM, Cambridge, UK	1E1	1:200	Cytoplasmatic
VEGF	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	A-20	1:300	Cytoplasmatic

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Flowchart and Experimental Groups



*plasma and fragments **based on BI-RADS (4C, 5 e 6)

Discussão

IV. DISCUSSÃO

Atualmente, a grande mortalidade por câncer de mama se deve, principalmente, ao diagnóstico tardio, fator que contribui para a progressão do tumor, angiogênese e, conseqüentemente, metástase (REDIG; MCALLISTER, 2013; INCA, 2019). Por esse motivo, é de especial interesse para as pacientes, pesquisas envolvidas na identificação e validação de miRNAs circulantes que possam ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico na rotina clínica (HEITZER et al., 2017). Este estudo teve como objetivo principal avaliar o potencial de dois miRNAs circulantes como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama. Ainda, também verificamos a expressão de ambos em fragmentos tumorais para esta neoplasia, além de validar a expressão de suas proteínas-alvo envolvidas na angiogênese.

Os resultados mostraram aumento da expressão do miR-210 e diminuição do miR-152 em amostras de fragmentos tumorais de câncer de mama. Já para as amostras de plasma, constatamos aumento dos níveis de expressão do miR-210 e, curiosamente, também do miR-152. Também verificamos que as proteínas HIF-1 α , IGF-1R e VEGF apresentaram aumento de expressão por imunohistoquímica em fragmentos de câncer de

mama. Entretanto, a proteína VHL apresentou expressão diminuída em amostras tumorais.

Sabe-se que altas taxas de mortalidade por câncer de mama também estão relacionadas à heterogeneidade intertumoral entre as pacientes (PRAT; PEROU, 2011; SONG et al., 2016). Além da complexidade intertumoral, o câncer de mama também apresenta alta heterogeneidade intratumoral (diferenças individuais de cada tumor). Condições adversas no microambiente tumoral, como hipóxia, acidose e estresse oxidativo, também podem exercer pressão seletiva durante a evolução do tumor, levando à "seleção natural" dentro do microambiente e assim, criando subpopulações com vantagens seletivas (ANSELL; VONDERHEIDE, 2013; KHRAMTSOV; GILLIES, 2014). Por essa série de fatores envolvidos na complexidade do câncer de mama, uma única amostra obtida por biópsia ou ressecção cirúrgica fornece informações espacialmente e temporariamente limitadas do tumor (ILIÉ; HOFMAN, 2016).

Muitos esforços já foram feitos na tentativa de validar bons biomarcadores para o câncer de mama. Para esta neoplasia, o antígeno de carcinoma 15.3 (CA 15.3) é o biomarcador sanguíneo mais utilizado na rotina clínica atual. No entanto, em pacientes com estágio inicial da doença, ele é capaz de detectar somente 23% dos casos (DUFFY; EVOY; MCDERMOTT, 2010). Portanto, ainda não há na rotina clínica, um biomarcador que possa detectar precocemente tumores malignos de mama

e prever a evolução clínica da doença, além de possuir o benefício de ser quantificado por uma técnica minimamente invasiva e rotineiramente (DUFFY et al., 2017).

Os miRNAs circulantes estão emergindo como biomarcadores inovadores para detecção precoce de diversas neoplasias, previsão do prognóstico e monitoramento do efeito da terapia (WANG et al., 2018). Obtidos a partir de fluidos biológicos, estes biomarcadores tem vantagens em relação ao biomarcadores de tecido, pois são facilmente obtidos e também podem ser monitorados rotineiramente, resultando em uma detecção em tempo real, e, conseqüentemente, em diagnóstico e prognóstico efetivos (MADHAVAN et al., 2016; HEITZER et al., 2017; FETTKE; KWAN; AZAD, 2018; QI et al., 2018). Assim, podemos afirmar que a biópsia líquida consiste, atualmente, em um grande avanço para a medicina personalizada, podendo gerar grandes benefícios para pacientes oncológicos (MATTOS-ARRUDA; CALDAS, 2016).

No câncer de mama, o miR-210 vem sendo descrito como um dos mais consistentes miRNAs para esta neoplasia (DEVLIN et al., 2011; JUNG et al., 2013; QIN; FURONG; BAOSHENG, 2014). Neste estudo, os resultados mostraram aumento dos níveis de expressão do miR-210 em amostras de fragmentos tumorais. Em concordância, Shidfar e colaboradores (2017) observaram que a expressão deste miRNA estava aumentada no grupo caso (amostras mamárias benignas que desenvolveram câncer de mama

em até 1 ano) em relação ao grupo controle (amostras mamárias benignas que permaneceram livres de câncer de mama até o momento da inclusão no estudo) (SHIDFAR et al., 2017). Thakur e colaboradores (2016) também observaram aumento da expressão do miR-210 em fragmentos e em linhagens celulares (MDA-MB-231 e MCF-10) de câncer de mama (THAKUR et al., 2016). Além disso, estudos mostraram que a superexpressão deste miRNA no câncer de mama está relacionada com agressividade tumoral e metástases à distância (TOYAMA et al., 2012; BAR et al., 2017).

Posteriormente, as expressões das proteínas-alvo do oncomiR-210 envolvidos com a via da angiogênese foram validadas. O HIF-1 α promove o aumento da expressão de miR-210 e este, leva a estabilização de HIF-1 α , e conseqüentemente, aumento dos níveis de VEGF (DANG; MYERS, 2015). Ainda, a proteína VHL pode atuar nesta via por meio da degradação proteolítica de HIF-1 α (TANIMOTO, 2000; RAHIMI, 2012).

Em amostras de câncer de mama, este estudo verificou aumento dos níveis de expressão HIF-1 α e diminuição dos níveis de VHL. Em concordância, Gruber e colaboradores (2004) também observaram que o HIF-1 α apresentou aumento de expressão por imunohistoquímica em 56% das amostras de pacientes com câncer de mama. Além disso, também observaram que a superexpressão do HIF-1 α estava relacionada a uma menor taxa de sobrevida livre de metástases à distância (GRUBER et al.,

2004). Em tumores de neuroblastoma, Ognibene e colaboradores (2017) também observaram que a maioria dos tumores hipóxicos apresenta alta expressão de HIF-1 α , sendo este um indicador prognóstico para estratificar pacientes de alto risco (OGNIBENE et al., 2017). Outro estudo mostrou que o aumento de expressão de HIF-1 α em tecidos de câncer pancreático estava relacionada com uma maior agressividade tumoral e um menor tempo de sobrevida (WANG et al., 2015).

Com relação à proteína VHL, Zia e colaboradores (2007) já haviam encontrado diminuição dos níveis de expressão da proteína VHL em amostras de câncer de mama. Os autores também concluíram que o VHL, *in vitro*, exerce efeitos inibitórios sobre a capacidade invasiva e migratória das células tumorais (ZIA et al., 2007). Ainda, em células de carcinoma renal, a análise por densitometria revelou que a expressão proteica de VHL em tecido cancerígeno foi menor quando comparada com o tecido normal adjacente dos pacientes (HÖGNER et al., 2018).

Outro miRNA abordado neste estudo foi o miR-152. Este é considerado um miRNA supressor tumoral bem validado em diversas neoplasias, incluindo câncer de mama (XU et al., 2013; ZHANG et al., 2017). Neste estudo, foi observado diminuição dos níveis de expressão do miR-152 em fragmentos tumorais. Em concordância com estes achados, Wen e colaboradores (2017) verificaram que os níveis de expressão de miR-152 foram significativamente menores em fragmentos de câncer de mama do

que em tecidos não tumorais (WEN et al., 2017). Além disso, um estudo anterior investigou o papel deste miRNA na iniciação e progressão do câncer de mama e descobriram que a expressão de miR-152 foi significativamente reduzida em fragmentos e em linhagens celulares de câncer de mama (GE et al., 2017).

O miR-152 atua na via da angiogênese como um supressor tumoral levando ao bloqueio do IGF-1R (XU et al., 2013). De acordo com a literatura, a ligação do fator IGF-1 ao IGF-1R ativa a cascata PI3K / AKT via mTOR, induzindo a expressão de HIF-1 α e VEGF (CHIU et al., 2011). Na etapa de validação, os resultados mostraram níveis de expressão elevados de IGF-1R por imunohistoquímica em câncer de mama. Em concordância com estes achados, estudos anteriores observaram superexpressão de IGF-1R em amostras de câncer de mama e concluíram, ainda, que a expressão desta proteína está relacionada com a heterogeneidade dos subtipos moleculares de câncer de mama (SUN et al., 2015). Em linhagens de câncer de pulmão, autores demonstraram que níveis de expressão elevados de IGF-1R estava relacionado ao aumento da resistência da linhagem ao fármaco Gefitinibe® (atua inibindo a proliferação celular, bloqueio de mecanismos apoptóticos e angiogênese) (PELED et al., 2013).

Ambas as vias de sinalização do miR-210 e miR-152 tem interferência final na proteína VEGF, que culminará no desenvolvimento de novos vasos

sanguíneos para o microambiente tumoral (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006). Neste estudo, foi validada a expressão de VEGF em amostras de câncer de mama. Assim como nossos resultados, estudos anteriores já haviam verificado o aumento desta proteína no câncer de mama e também em outras neoplasias (MAAE et al., 2011; ZANG et al., 2012; ALEVIZAKOS; KALTSAS; SYRIGOS, 2013; WEN et al., 2019).

Após verificarmos a expressão desses miRNAs e de suas proteínas-alvo em fragmentos tumorais de câncer de mama, questionamos se eles poderiam ser potenciais biomarcadores circulantes para essa neoplasia.

Os resultados deste estudo mostraram que os níveis do miR-210 estavam aumentados em amostras de plasma de mulheres com câncer de mama. Em concordância, Madhavan et al. (2016) observaram que o miR-210 apresentou níveis elevados em plasmas de mulheres com câncer de mama e sua expressão foi associada ao aparecimento de metástases em até 2 anos após a confirmação do diagnóstico (MADHAVAN et al., 2016). Markou et al. (2016) também encontraram níveis plasmáticos de miR-210 significativamente elevados em mulheres com câncer de mama metastático em comparação com mulheres saudáveis (MARKOU et al., 2016). Ainda, outro estudo mostrou que os níveis circulantes deste miRNA estava aumentado no câncer colorretal e esta superexpressão foi associada com prognóstico reservado (WANG et al., 2016; SABRY et al., 2018). Níveis

circulantes aumentados do miR-210 também foram anteriormente observados em câncer gástrico (PENG et al., 2018) e em câncer renal (DIAS et al., 2017).

Com relação ao miR-152, os resultados mostraram aumento dos níveis circulantes em mulheres com câncer de mama. Este foi um achado interessante neste estudo porque, como já descrito, o miR-152 possui ação supressora em fragmentos de neoplasias mamárias. Na literatura, há apenas um estudo envolvendo o miR-152 e amostras de sangue de pacientes com câncer de mama. Os autores também observaram níveis plasmáticos aumentados de miR-152 em pacientes com a doença e em pacientes com lesões benignas em comparação com o grupo controle. Da mesma forma, esta observação do aumento da expressão plasmática do miR-152 em vários pacientes com câncer foi inesperada para os autores, porque o miR-152 é considerado regulado negativamente nos fragmentos tumorais (CHEN et al., 2016). No entanto, em amostras de plasmas de carcinoma hepatocelular, WANG e colaboradores (2016) verificaram que a família miR-148/152 apresentou níveis circulantes diminuídos, e portanto, este miRNA apresentou potencial como biomarcador de diagnóstico para essa doença (WANG et al., 2016). Além disso, outros estudos mostraram que em câncer de próstata (MATIN et al., 2018) e ovário (LANGHE et al., 2015) os níveis circulantes deste miRNA foi regulado negativamente.

Muitas especulações surgiram nos últimos anos para o entendimento dos mecanismos que levam ao aumento dos níveis de miRNAs circulantes. Acredita-se que os miRNAs provenientes de tumores e liberados na corrente sanguínea são resistentes às ribonucleases pois são empacotados em microvesículas excretoras (por exemplo, exossomos), mas pouco se sabe sobre como e por que tais mudanças ocorreriam no nível de miRNAs circulantes (PEGTEL et al., 2010; KOMATSU et al., 2011). Acredita-se que a lise celular ou o aumento do número de exossomos rompidos nas células tumorais contribuem para níveis elevados de miRNAs no sangue (CHENG, 2014; FALCONE; FELSANI; D'AGNANO, 2015).

Novos estudos devem ser realizados para o entendimento dos mecanismos que levam ao aumento de microRNAs circulantes, incluindo aqueles que possuem ação supressora tumoral. Apesar do aumento dos níveis do supressor tumoral miR-152 em amostras de plasma de mulheres com câncer de mama, nossos resultados mostraram que este apresentou potencial, nesta *coorte* experimental, em diagnosticar e, ainda, diferenciar mulheres com câncer de mama de bom prognóstico daquelas com prognóstico reservado. Portanto, o miR-210 e miR-152 apresentaram potencial como biomarcadores de câncer de mama por biópsia líquida.

Conclusão

V. CONCLUSÃO

Esses resultados podem contribuir para o uso desses dois promissores biomarcadores circulantes no diagnóstico precoce e prognóstico de pacientes com câncer de mama, além do benefício de serem detectados por biópsia líquida, uma ferramenta promissora e minimamente invasiva. No futuro, também espera-se que esses miRNAs possam ser potenciais alvos terapêuticos, contribuindo para avanços na medicina personalizada.

Referências

VI. REFERÊNCIAS

AARTHY, R. et al. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 19, n. 6, p. 339–350, 2015.

ACUNZO, M. et al. MicroRNA and cancer – A brief overview. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, p. 1–9, 2015.

AGOSTINI, M. et al. miRNAs in colon and rectal cancer: A consensus for their true clinical value. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 17–18, p. 1181–1186, 2010.

AJCC. **7th Edition Staging for Breast Cancer**. Disponível em: <<https://cancerstaging.org>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

ALEVIZAKOS, M.; KALTSAS, S.; SYRIGOS, K. N. The VEGF pathway in lung cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1169–1181, 2013.

ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. **Cancer Discovery**, n. 1, p. 479–491, 2013.

ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 5, p. 479–491, 2016.

ALVES, G.; DELMONICO, L. O presente e o futuro dos marcadores circulantes de câncer. **HUPE**, v. 14, p. 66–72, 2015.

AMORIM, M. et al. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 265–, 2016.

ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 53, n. 1, p. 641–653, 1996.

ANSELL, S. M.; VONDERHEIDE, R. H. Cellular Composition of the Tumor Microenvironment. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, p. 91–97, 2013.

BACH, D. H. et al. The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 2, p. 220–230, 2017.

BAR, I. et al. The MicroRNA miR-210 Is Expressed by Cancer Cells but Also by the Tumor Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 65, n. 6, p. 335–346, 2017.

BARROS, A. C. S. D.; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. Molecular classification of breast cancer: a contemporary view. **Revista Brasileira de Mastologia**,

v. 25, n. 4, p. 146–155, 2015.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BAUM, M. 'Catch it early, save a life and save a breast': This misleading mantra of mammography. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 108, n. 9, p. 338–339, 2015.

BECKER, A. et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. **Cancer Cell**, v. 30, n. 6, p. 836–848, 2016.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 401, p. 401–410, 2003.

BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122–1143, 2015.

BEUMER, I. J. et al. Prognostic value of MammaPrint® in invasive lobular breast cancer. **Biomarker Insights**, v. 11, p. 139–146, 2016.

BILLER-ANDORNO, N.; JUNI, P. Abolishing Mammography Screening Programs? A View from the Swiss Medical Board Nikola. **Perspective**, v. 370, n. 21, p. 1965–1967, 2014.

BLEYER, A.; WELCH, H. G. Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 21, p. 1998–2005, 2012.

BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast cancer research : BCR**, v. 5, n. 3, p. 140–146, 2003.

BRACONI, C.; HUANG, N.; PATEL, T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. **Hepatology**, v. 51, n. 3, 2010.

BRODERSEN, J.; SIERSMA, V. D. Long-Term Psychosocial Consequences of False-Positive Screening Mammography. **Annals Of Family Medicine**, v. 11, n. 2, p. 106–115, 2013.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15524–9, 2002.

CALIN, G. A. et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1793–1801, 2005.

CAMPS, C. et al. Hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5,

p. 1340–1348, 2008.

CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 6, p. 321–328, 2001.

CAPPELLARI, O.; COSSU, G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. **Circulation Research**, v. 113, n. 3, p. 341–347, jul. 2013.

CARMELIET, P.; RAKESH, J. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **National Institutes of Health**, v. 473, n. 7347, p. 287–307, 2011.

CASTAÑEDA-GILL, J.; VISHWANATHA, J. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. **Journal of Carcinogenesis**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 5, p. 601–615, 2006.

CHEN, H. et al. Evaluation of plasma miR-21 and miR-152 as diagnostic biomarkers for common types of human cancers. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 5, p. 490–499, 2016.

CHEN, J. et al. Circulating miR-152 helps early prediction of postoperative biochemical recurrence of prostate cancer. **Zhonghua Nan Ke Xue**, v. 23, n. 7, p. 603–608, 2017.

CHEN, W. et al. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. **NPJ precision oncology**, v. 2, n. 1, p. 4, 2018.

CHEN, Y.; SONG, Y.-X.; WANG, Z.-N. The MicroRNA-148/152 Family: Multi-faceted Players. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 43, 2013.

CHENG, G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 81, p. 1–19, 2014.

CHIU, C. J. et al. Associations between genetic polymorphisms of insulin-like growth factor axis genes and risk for age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, n. 12, p. 9099–9107, 2011.

CHUBAK, J. et al. Cost of breast-related care in the year following false positive screening mammograms. **Medical Care**, v. 48, n. 9, p. 815–820, 2010.

CHUNG, A. S.; LEE, J.; FERRARA, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 7, p. 505–514, 2010.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606–616, 2004.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos Moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, p. 499–503, 2011.

- CLAUS, E. B. et al. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. **Cancer**, v. 77, n. 11, p. 2318–2324, 1996.
- CORCORAN, C. et al. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 18–32, 2011.
- CRAWFORD, Y.; FERRARA, N. VEGF inhibition: Insights from preclinical and clinical studies. **Cell and Tissue Research**, v. 335, n. 1, p. 261–269, 2009.
- CROWLEY, E. et al. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 8, p. 472–484, 2013.
- DALTON, W. S.; FRIEND, S. H. Cancer biomarkers - An invitation to the table. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1165–1168, 2006.
- DANG, K.; MYERS, K. The Role of Hypoxia-Induced miR-210 in Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 6353–6372, 2015.
- DESANTIS, C. et al. Breast cancer facts & figures. **American Cancer Society**, p. 1–36, 2010.
- DEVLIN, C. et al. MiR-210: More than a silent player in hypoxia. **IUBMB Life**, v. 63, n. 2, p. 94–100, 2011.
- DI NUNNO, V. et al. Recent Advances in Liquid Biopsy in Patients With Castration Resistant Prostate Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 1–9, 2018.
- DIAS, F. et al. Plasmatic miR-210, miR-221 and miR-1233 profile: Potential liquid biopsies candidates for renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 103315–103326, 2017.
- DUFFY, M. J. et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 284–298, 2017.
- DUFFY, M. J.; EVOY, D.; MCDERMOTT, E. W. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1869–1874, 2010.
- DUTTAGUPTA, R. et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer De Mama: Marcadores Tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 377–388, 2001.
- ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–269, 2006.
- FALCONE, G.; FELSANI, A.; D'AGNANO, I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 1–10, 2015.

- FAUPEL-BADGER, J. M. et al. Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: Summary of a national cancer institute-sponsored workshop. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 3, p. 166–174, 2013.
- FETTKE, H.; KWAN, E. M.; AZAD, A. A. Cell-free DNA in cancer: current insights. **Cellular Oncology**, v. 42, n. 1, 2018.
- GE, S. et al. Function of miR-152 as a Tumor Suppressor in Human Breast Cancer by Targeting PIK3CA. **Oncology Reserach**, v. 25, p. 1363–1371, 2017.
- GERHARDT, H. et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 6, p. 1163–1177, 2003.
- GIULIANO, A. E. et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 4, p. 290–303, 2017.
- GLOBOCAN. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012.
- GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.
- GORGANNEZHAD, L. et al. Circulating tumor DNA and liquid biopsy: Opportunities, challenges, and recent advances in detection technologies. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 8, p. 1174–1196, 2018.
- GOTZSCHE, P.; JORGENSEN, K. Screening for breast cancer with mammography. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, n. 6, 2013.
- GRESS, D. M. et al. AJCC Cancer Staging Manual. **American Joint Comittee on Cancer**, v. 304, n. 15, p. 1726, 2017.
- GRUBER, G. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: An independent prognostic parameter? **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 191–198, 2004.
- GULYAEVA, L. F.; KUSHLINSKIY, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2016.
- HABER, D. A.; VELCULESCU, V. E. Liquid biopsies: Genotyping circulating

- tumor DNA. **Nature Medicine**, v. 4, n. 6, 2014.
- HADDAD, C. F. Trastuzumab no câncer de mama. **Femina**, v. 38, n. 2, p. 73–78, 2010.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 646–674, 2011.
- HAQUE, R. et al. MicroRNA-152 represses VEGF and TGF β 1 expressions through post-transcriptional inhibition of (Pro)renin receptor in human retinal endothelial cells. **Molecular Vision**, v., 21, p. 224-235, 2015.
- HE, J. et al. Roles and Mechanism of miR-199a and miR-125b in Tumor Angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 7, p. 522–531, 2004.
- HEITZER, E. et al. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2017.
- HEITZER, E.; ULZ, P.; GEIGL, J. B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 112–123, 2015.
- HIROKI, E. et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. **Cancer Science**, v. 101, n. 1, p. 241–249, jan. 2010.
- HÖGNER, A. et al. PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 36, n. 3, p. 1–14, 2018.
- HSIAO, Y. H. et al. Breast cancer heterogeneity: Mechanisms, proofs, and implications. **Journal of Cancer**, v. 1, n. 1, p. 6–13, 2010.
- HUANG, M.-X. Down-expression of circulating micro ribonucleic acid (miRNA)-148/152 family in plasma samples of non-small cell lung cancer patients. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 671–675, 2016.
- HUEN, M. S. Y.; SY, S. M. H.; CHEN, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 138–148, 2010.
- HUO, D. et al. Identification of a circulating MicroRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, 2016.
- IGNATIADIS, M.; LEE, M.; JEFFREY, S. S. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: Challenges and opportunities on the path to clinical utility. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 21, p. 4786–4800, 2015.

- ILIÉ, M.; HOFMAN, P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n. 4, p. 420–423, 2016.
- INCA. **ABC do câncer: abordagens práticas para o controle do câncer (2011)**. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso: 20 jan. 2019.
- INCA. Diretrizes para a detecção precoce do Câncer de Mam. **Instituto Nacional do Câncer.**, v. 32, n. 8, p. 168, 2015.
- INCA. **Instituto Nacional do Câncer - Estimativa 2018**. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso: 20 jan. 2019.
- INCA. **Tipos de Câncer - Câncer de Mama 2019**). Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- JOOSSE, S. A.; GORGES, T. M.; PANTEL, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2015.
- JUNG, E.-J. et al. Plasma miR-210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. **Cancer**, v. 118, n. 10, p. 1–20, 2013.
- JURKOVICOVA, D. et al. Down-regulation of traditional oncomiRs in plasma of breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 77369–77384, 2017.
- KALISHWARALAL, K.; KWON, W. Y.; PARK, K. S. Exosomes for non-invasive cancer monitoring. **Biotechnology Journal**, 2018.
- KARAKASHEV, S. V.; REGINATO, M. J. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. **Cancer Management and Research**, v. 7, p. 253–264, 2015.
- KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of Angiogenesis. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 7, p. 751–762, 2008.
- KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 1469–1480, 2006.
- KEKLIKOGLOU, I. et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. **Oncogene**, v. 31, p. 4150–4163, 2012.
- KERLIKOWSKE, K. et al. Comparative Effectiveness of Digital Versus Film-Screen Mammography in Community Practice in the United States: A cohort Study. **National Institutes of Health**, v. 155, n. 8, p. 493–502, 2011.
- KHRAMTSOV, V. V.; GILLIES, R. J. Janus-Faced Tumor Microenvironment and Redox. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 5, p. 723–729, 2014.
- KIERAN, M. W.; KALLURI, R.; CHO, Y.-J. The VEGF pathway in cancer

and disease: responses, resistance, and the path forward. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 12, 2012.

KIRTON, L. Analysis of miRNA and mRNA associated with Epithelial Mesenchymal Transition. **Bioinformatics PFUG**. Disponível em: <<https://archive.cnx.org/>>. Acesso: 31 jan. 2019.

KOMATSU, S. et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma? **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 104–111, 2011.

KOPANS, D. B. **Breast Imaging**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KRISTENSEN, T. et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 23024–23041, 2014.

LA VECCHIA, C. et al. Overweight, Obesity, Diabetes, and Risk of Breast Cancer: Interlocking Pieces of the Puzzle. **The Oncologist**, v. 16, n. 6, p. 726–729, 2011.

LANGHE, R. et al. A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 628–636, 2015.

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**, v. 75, n. 5, p. 843–54, dez. 1993.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003.

LI, G. et al. Detection of urinary cell-free miR-210 as a potential tool of liquid biopsy for clear cell renal cell carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 35, n. 5, p. 294–299, 2017.

LI, W. et al. The association between expressions of Ras and CD68 in the angiogenesis of breast cancers. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 17, 2015.

LIU, D. et al. MicroRNA-210 interacts with FBXO31 to regulate cancer proliferation cell cycle and migration in human breast cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 5245–5255, 2016.

LIU, X. et al. MiR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. **Oncology Letters**, v. 11, p. 3911–3916, 2016.

LYNCH, H. T.; SNYDER, C.; LYNCH, J. Hereditary breast cancer: Practical pursuit for clinical translation. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1723–1731, 2012.

MA, H. et al. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint

- estrogen and progesterone receptor status: A meta-analysis of epidemiological studies. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2006.
- MAAE, E. et al. Estimation of immunohistochemical expression of VEGF in ductal carcinomas of the breast. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 59, n. 8, p. 750–760, 2011.
- MADHAVAN, D. et al. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. **Frontiers in genetics**, v. 4, n. 116, p. 1–13, 2013.
- MADHAVAN, D. et al. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 5, p. 461–470, 2016.
- MARKOU, A. et al. Direct comparison of metastasis-related miRNAs expression levels in circulating tumor cells, corresponding plasma, and primary tumors of breast cancer patients. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1002–1011, 2016.
- MARTIN, L. J.; BOYD, N. F. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: Hypotheses based on epidemiological evidence. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2008.
- MATIN, F. et al. A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 6653, p. 1–15, 2018.
- MATTOS-ARRUDA, L.; CALDAS, C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 3, p. 464–474, 2016.
- MCGUIRE, A.; BROWN, J. A. L.; KERIN, M. J. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 1, p. 145–155, 2015.
- MCVEIGH, T. P.; KERIN, M. J. Clinical use of the oncoPrint DX genomic test to guide treatment decisions for patients with invasive breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 9, p. 393–400, 2017.
- MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. v. 105, n. 30, p. 10513–10518, 2008.
- MOTALLEBNEZHAD, M. et al. The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11711–11721, 2016.
- NIEDER, C. et al. Prognostic Impact of the Tumor Marker CA 15-3 in Patients With Breast Cancer and Bone Metastases Treated With Palliative Radiotherapy. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 9, n. 3, p. 183–187, 2017.

OGNIBENE, M. et al. Immunohistochemical analysis of PDK1, PHD3 and HIF-1 α expression defines the hypoxic status of neuroblastoma tumors. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–19, 2017.

ØROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. **Molecular Cell**, v. 30, n. 4, p. 460–471, 2008.

PARK, W. et al. New perspectives of curcumin in cancer prevention. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 6, n. 5, p. 387–400, 2013.

PEGTEL, D. M. et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 14, p. 6328–6333, 2010.

PELED, N. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a biomarker for resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer. **Cellular Oncology**, v. 36, n. 4, p. 277–288, 2013.

PENG, W. et al. The correlation of circulating pro-angiogenic miRNAs' expressions with disease risk, clinicopathological features, and survival profiles in gastric cancer. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 8, p. 3773–3791, 2018.

PEROU, C. M. et al. Molecular Portraits Breast Cancer. **Nature**, v. 406, p. 747–752, 2000.

PLUMMER, P. N. et al. MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 1, p. 341–352, 2012.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5–23, 2011.

QI, Z. H. et al. The significance of liquid biopsy in pancreatic cancer. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 18, p. 3417–3426, 2018.

QIN, Q.; FURONG, W.; BAOSHENG, L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 33, n. 50, p. 2–10, 2014.

RAHIMI, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 3, p. 538–548, mar. 2012.

REDIG, A. J.; MCALLISTER, S. S. Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. **Journal of Internal Medicine**, v. 274, n.2, 113-126, 2013.

REISNER, H. M. **Patologia - Uma abordagem por estudos de casos**. 1. ed. McGraw, p444-446, 2016.

ROBERTSON, E. G.; BAXTER, G. Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: The real story! **Clinical Radiology**, v. 66, n. 11, p. 1007–1014, 2011.

ROTH, C. et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients

- with primary and metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, p. 2–8, 2010.
- RUNDQVIST, H.; JOHNSON, R. S. Tumour oxygenation: Implications for breast cancer prognosis. **Journal of Internal Medicine**, v. 274, n. 2, p. 105–112, 2013.
- SABRY, D. et al. Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p-1-13, 2018.
- SAMANI, A. A. et al. The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 20–47, fev. 2007.
- SCHRAUDER, M. G. et al. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- SEMENZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 62–67, 2002.
- SENGUPTA, D. et al. DNA methylation and not H3K4 trimethylation dictates the expression status of miR-152 gene which inhibits migration of breast cancer cells via DNMT1/CDH1 loop. **Experimental Cell Research**, v. 346, n. 2, p. 176–187, 2016.
- SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 575–580, 2014.
- SHAH, N. M. et al. Understanding the role of NRF2-regulated miRNAs in human malignancies. **Oncotarget**, v. 4, n. 8, p. 1130–42, 2013.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2009.
- SHIDFAR, A. et al. Expression of *miR-18a* and *miR-210* in Normal Breast Tissue as Candidate Biomarkers of Breast Cancer Risk. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 1, p. 89–97, 2017.
- SONG, J. et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 4, p. 897–904, 2012.
- SONG, J. L. et al. Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 12, p. 3475–3488, 2016.
- SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.
- STEFANINI, M. O. et al. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. **BMC systems biology**, v. 2, p. 77, 2008.

- STRACHAN, T.; READ, A. . **Genética molecular humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- SUN, W. et al. Insulin-like growth factor 1 receptor expression in breast cancer tissue and mammographic density. **Molecular and clinical oncology**, v. 3, n. 3, p. 572–580, 2015.
- TAKAHASHI, H. et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical science**, v. 109, n. 3, p. 227–41, 2005.
- TANEJA, P. et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, v. 4, p. 15–34, abr. 2010.
- TANIMOTO, K. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 16, p. 4298–4309, 2000.
- TEEGARDEN, D.; ROMIEU, I.; LELIÈVRE, S. A. Redefining the impact of nutrition on breast cancer incidence: Is epigenetics involved? **Nutrition Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 68–95, 2012.
- THAKUR, S. et al. Identification of Specific miRNA Signature in Paired Sera and Tissue Samples of Indian Women with Triple Negative Breast Cancer. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2016.
- TOMINAGA, N.; KATSUDA, T.; OCHIYA, T. Micromanaging of tumor metastasis by extracellular vesicles. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 52–59, 2015.
- TORRE, L.; SIEGEL, R.; AHMEDIN, J. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. **American Cancer Society**, n. 800, p. 1–64, 2015.
- TOYAMA, T. et al. High Expression of MicroRNA-210 is an Independent Factor Indicating a Poor Prognosis in Japanese Triple-negative Breast Cancer Patients. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 42, n. 4, p. 256–263, 2012.
- TSUCHIYA, S. et al. MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 420–428, 2011.
- TSURUTA, T. et al. miR-152 Is a Tumor Suppressor microRNA That Is Silenced by DNA Hypermethylation in Endometrial Cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 20, p. 6450–6462, out. 2011.
- VALENCIA, O. M. et al. The role of genetic testing in patients with breast cancer a review. **JAMA Surgery**, v. 152, n. 6, p. 589–594, 2017.
- VIEIRA, A. V.; TOIGO, F. T. Classificação BI-RADS™: categorização de 4.968 mamografias. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 205–208, 2002.
- WAN, J. C. M. et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation

of circulating tumour DNA. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, p. 1–16, 2017.

WANG, F. et al. Circulating miR-148/152 family as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4945–4953, 2016.

WANG, M. et al. Expression and significance of HIF-1 α and HIF-2 α in pancreatic cancer. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 35, n. 6, p. 874–879, 2015.

WANG, S.; OLSON, E. N. AngiomiRs—Key regulators of angiogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, n. 3, p. 205–211, 2009.

WANG, W. et al. Circulating miR-210 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. **European Journal of Cancer Care**, v. 26, n. 4, 2016.

WANG, Y. et al. Downregulated circulating microRNAs after surgery: potential noninvasive biomarkers for diagnosis and prognosis of early breast cancer. **Cell Death Discovery**, p. 1–8, 2018.

WANG, Z. et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p.224–243, 2015.

WEI, J. et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 6, p. 407–414, 2011.

WEN, S. et al. Apatinib regulates the cell proliferation and apoptosis of liver cancer by regulation of VEGFR2/STAT3 signaling. **Pathology Research and Practice**, p. 1–6, 2019.

WEN, Y. Y. et al. IGF-1-mediated PKM2/ β -catenin/miR-152 regulatory circuit in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

WIKLUND, E. D. et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, mar. 2009.

WIRATKAPUN, C. et al. Biopsy rate and posibreast cancer in BI-RADS category 4 breast lesions.tive predictive value for. **J Med Assoc Thai**, v. 93, n. 7, p. 830–837, 2010.

WU, F.-T. et al. Circulating tumor DNA: clinical roles in diffuse large B cell lymphoma. **Annals of Hematology**, v. 98, n. 2, p. 255–269, 2018.

WU, L. et al. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. **Molecular Cell**, v. 38, n. 3, p. 465–475, 2010.

XIN, L. et al. The Era of Multigene Panels Comes? The Clinical Utility of

Oncotype DX and MammaPrint. **World Journal of Oncology**, v. 8, n. 2, p. 34–40, 2017.

XU, Q. et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 3–13, 2013.

YANG, J.; HAO, Y.; XI, J. J. Therapeutic application of MicroRNAs against human cancers. **Journal of Laboratory Automation**, v. 18, n. 1, p. 30–33, 2013.

YANG, W. et al. Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 8, p. 944–954, 2012.

ZANG, J. et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer: A meta-analysis. **Head Neck**, v. 35, n. 10, p. 1507–1514, 2012.

ZHANG, H. et al. MicroRNA-152 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting angiogenesis-related growth factors in human gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 21, n. 1, p. 41–54, 2017.

ZHANG, H.; LI, Y.; LAI, M. The microRNA network and tumor metastasis. **Oncogene**, v. 29, n. 7, p. 937–948, 2010.

ZHANG, J. et al. Prevalence and characterization of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Chinese women with familial breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 2, p. 421–428, 2012.

ZHANG, J.; POWELL, S. N. The Role of the BRCA1 Tumor Suppressor in DNA Double-Strand Break Repair. **Molecular Cancer Research**, v. 3, n. 10, p. 531–539, 2005.

ZHANG, Y. et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. **RNA**, v. 20, n. 12, p. 1878–89, 2014.

ZHANG, Z. et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. **Cell Cycle**, v. 8, n. 17, p. 2756–2768, 2009.

ZHAO, L. et al. Diagnostic role of immunohistochemistry in the evaluation of breast pathology specimens. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 138, n. 1, p. 16–24, 2014.

ZHOU, X. et al. Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. **Oncology Reports**, v. 27, n. 2, p. 447–54, 2012.

ZHU, X.; ZHOU, W. The emerging regulation of VEGFR-2 in triple-negative breast cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. 159, p.1-7, 2015.

ZIA, M. K. et al. The expression of the von Hippel-Lindau gene product and its impact on invasiveness of human breast cancer cells. **International journal of molecular medicine**, v. 20, n. 4, p. 605–611, 2007.

VII. APÊNDICE A - Grupo I – Amostras incluídas neste trabalho com suas respectivas informações. (PP = prognóstico patológico).

AMOSTRA	IDADE	ESTADIAMENTO PP	GRAU	METÁSTASE A DISTÂNCIA	RE	RP	HER2
BC-01	65	IIIA	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-02	74	IA	1	Não	Sim	Sim	Não
BC-03	60	IB	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-04	68	IA	2	Não	Sim	Sim	Sim
BC-07	60	IIIB	2	Não	Sim	Sim	Sim
BC-10	71	IA	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-11	38	IIIC	3	Não	Não	Não	Não
BC-18	73	IV	2	Sim	Não	Não	Sim
BC-19	70	IA	2	Não	Sim	Sim	Sim
BC-21	54	IIIB	2	Não	Sim	Não	Sim
BC-25	64	IIB	2	Não	Sim	Sim	Sim
BC-30	79	IIIB	2	Não	Sim	Não	Sim
BC-32	68	IV	3	Sim	Não	Não	Não
BC-34	55	IIB	2	Não	Não	Não	Sim
BC-40	69	I	1	Não	Sim	Sim	Não
BC-42	31	IV	2	Sim	Não	Não	Não
BC-44	34	IIIB	3	Não	Não	Não	Sim
BC-46	69	IV	3	Sim	Sim	Sim	Sim
BC-48	33	IB	2	Não	Sim	Não	Sim
BC-49	62	IIIB	3	Não	Não	Não	Sim
BC-50	61	IA	1	Não	Sim	Sim	Não
BC-51	29	IIIC	3	Não	Não	Não	Não
BC-54	60	IV	2	Sim	Sim	Sim	Sim
BC-57	50	IA	2	Não	Sim	Sim	Sim
BC-58	58	IA	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-60	52	IV	2	Sim	Sim	Sim	Não
BC-62	78	IA	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-66	64	IA	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-68	77	IIIA	2	Não	Sim	Sim	Não
BC-69	53	IB	3	Não	Sim	Sim	Não

VII. APÊNDICE B- Termo De Consentimento Livre E Esclarecido (TCLE)

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: Assinatura de microRNAs circulantes no diagnóstico e prognóstico de mulheres com câncer de mama

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC / Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Oncologista - Responsável pela Unidade de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Hospital de Base

- Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto (SP) estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnósticos e de melhora na qualidade de vida;
- Para isso, uma amostra de sangue e um fragmento do tumor serão coletados e enviados ao laboratório para as análises.
- Se eu concordar que uma pequena quantidade de sangue e um pequeno fragmento do tumor sejam retirados e utilizados para a pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes dela.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pela pesquisadora sobre a utilização para estudo de uma amostra de sangue (5 mL) e um fragmento de tumor, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido (a) a qualquer tipo de pressão:

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do (a) participante:

Representante legal:

Prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do (a) pesquisador: Beatriz Camargo Lopes

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC

Beatriz Camargo Lopes – Pós-graduanda em Biociências no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer - LIMC

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

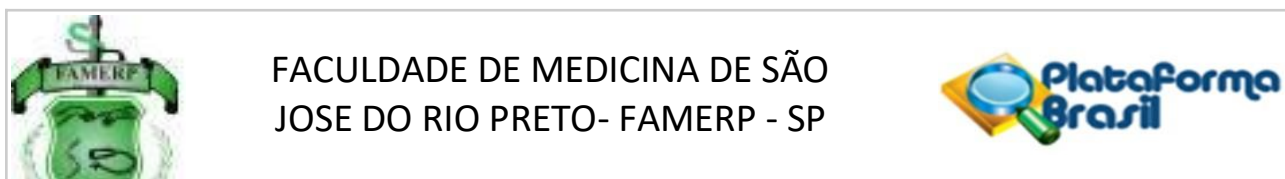
FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5885

e-mails: debora.zuccari@famerp.br; beatrizclbio@gmail.com

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5

Anexos

VIII. ANEXO – Emenda aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (última página)

Continuação do Parecer: 2.118.866

Básicas do Projeto	ETO_887766.pdf	15:23:49		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	26/05/2017 10:43:13	Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	26/05/2017 10:42:08	Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAtualizado.pdf	24/05/2017 09:58:53	Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimento.doc	23/05/2017 13:46:08	Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	23/05/2017 13:45:44	Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari	Aceito

Situação do Parecer:**Aprovado****Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 14 de Junho de 2017

Assinado por:**GERARDO MARIA DE ARAUJO FILHO****(Coordenador)****Endereço:** BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416**Bairro:** VILA SÃO PEDRO**CEP:** 15.090-000**UF:** SP**Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO**Telefone:** (17) 3201-5813 Fax: (17) 3201-5813**E-mail:** cepfamerp@famerp.br

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor