

FRANCIELE SCHLEMMER

**ASSINATURA DE MICRORNAS E EXPRESSÃO DE *PARP1* COMO
BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA NO CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO**

BRASÍLIA

2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FRANCIELE SCHLEMMER

ASSINATURA DE MICRORNAS E EXPRESSÃO DE *PARP1* COMO
BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA NO CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida

BRASÍLIA

FRANCIELE SCHLEMMER

ASSINATURA DE MICRORNAS E EXPRESSÃO DE *PARP1* COMO
BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA NO CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 17 de junho de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida (presidente)
Universidade de Brasília

Dra. Daniele Assad Suzuki (membro titular)
Hospital Sírio-Libanês

Dra. Paula Fontes Asprino (membro titular)
Hospital Sírio-Libanês

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira (membro titular)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fabio Pittella Silva (membro suplente)
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Titze de Almeida, agradeço a contribuição à minha formação pessoal e acadêmica, bem como por ter possibilitado a realização deste trabalho em um ambiente de respeito e autonomia.

Aos colegas do Laboratório de Terapia Gênica e demais laboratórios do melhor corredor da FAV (grade branca), agradeço pelas conversas acolhedoras e companhia ao longo desses anos.

Às pacientes participantes do estudo, agradeço a gentil contribuição para o progresso da ciência. Aos médicos João Nunes de Matos Neto e Miriam Monteiro Alvares Vilela, pela colaboração na busca das pacientes e na obtenção das amostras.

À Mary-Ann Xavier, parceira de profissão, meu braço direito e uma das pessoas mais brilhantes que já conheci: sem seu apoio, este trabalho não existiria. Muito obrigada!

Às amigas Paula Bellozi e Natália Montenegro, minhas companheiras fiéis nessa longa jornada científica, obrigada por sempre ouvirem, de coração aberto, todas as minhas angústias e pelas palavras de calma e incentivo.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, agradeço a compreensão diante da minha ausência física em momentos importantes, embora meu coração sempre tenha estado com vocês.

Ao Júnior, pelo amor, companheirismo, paciência e apoio incondicional em todos os aspectos da minha vida.

Às agências de fomento — CAPES, CNPq e FAPDF — pela viabilização financeira deste trabalho.

Um cientista que também é um ser humano não pode descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento permanece guardado na prateleira.

Albert Sabin

RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com tumores morfológica e clinicamente semelhantes apresentando respostas terapêuticas e prognósticos distintos. O subtipo triplo-negativo (TNBC) representa cerca de 15% dos casos e tem como principal abordagem terapêutica a quimioterapia. A resposta patológica completa (pCR), avaliada por meio do índice de carga residual tumoral (RCB), é alcançada por aproximadamente um terço das pacientes com TNBC, estando associada à sobrevida livre de doença em 5 anos superior a 90%. Nesse cenário, alterações em genes de reparo do DNA, como *BRCA1*, têm sido exploradas como biomarcadores para terapias dirigidas, incluindo inibidores da PARP. Além disso, os microRNAs (miRNAs) têm se destacado como potenciais biomarcadores para fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos, dada sua capacidade de modular vias oncogênicas e supressoras tumorais. Este estudo avaliou a expressão de miRNAs e *PARP1* nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 (Receptor Hormonal Positivo, HR+), MDA-MB-231 (TNBC, *BRCA1* competente) e MDA-MB-436 (TNBC, *BRCA1* mutado). A expressão de miRNAs foi avaliada também em amostras de biópsias de pacientes com TNBC, além de análises de dados clínicos e genômicos provenientes do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Nas análises in vitro, foram identificadas diferenças significativas na expressão basal de miR-7, miR-21, miR-671 e miR-146a entre linhagens hormônio-positivas e triplo-negativas, além de responsividade de miR-7, miR-21 e miR-146a ao paclitaxel. A expressão de *PARP1* foi mais elevada nas linhagens triplo-negativas, indicando possível associação com o subtipo molecular. Nas biópsias, identificamos miR-7, miR-21 e miR-146a com potencial preditivo de pCR em pacientes com TNBC. Análises da expressão desses miRNAs em amostras provenientes do banco de dados TCGA revelaram que miR-146a, isoladamente ou em combinação com miR-21, apresentou associação significativa com os desfechos clínicos PFI e DSS. Além disso, a baixa expressão combinada de miR-7, miR-21 e miR-146a foi associada a maior risco de progressão da doença. Os resultados reforçam a influência do contexto molecular na resposta à quimioterapia, e indicam a viabilidade de assinaturas baseadas em microRNAs como ferramentas preditivas e prognósticas no câncer de mama triplo-negativo.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo-negativo (TNBC); microRNAs; PARP1; Biomarcadores; Resposta Patológica Completa; paclitaxel; TCGA.

ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous disease in which morphologically similar tumors may exhibit distinct therapeutic responses and prognoses. The triple-negative subtype (TNBC) accounts for approximately 15% of cases and is primarily treated with chemotherapy. Pathological complete response (pCR), assessed through the Residual Cancer Burden (RCB) index, is achieved in about one-third of TNBC patients and is associated with a five-year disease-free survival rate exceeding 90%. In this context, alterations in DNA repair genes, such as *BRCA1*, have been explored as biomarkers for targeted therapies, including PARP inhibitors. Additionally, microRNAs (miRNAs) have emerged as potential biomarkers for diagnostic, prognostic, and therapeutic applications, given their capacity to modulate oncogenic and tumor suppressor pathways. This study evaluated the expression of miRNAs and *PARP1* in breast cancer cell lines MCF-7 (Hormone Receptor Positive, HR+), MDA-MB-231 (TNBC, *BRCA1*-proficient), and MDA-MB-436 (TNBC, *BRCA1*-mutated). miRNA expression was also assessed in biopsy samples from TNBC patients, along with analyses of clinical and genomic data obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA). In vitro analyses revealed significant differences in the basal expression of miR-7, miR-21, miR-671, and miR-146a between hormone receptor-positive and triple-negative cell lines, as well as responsiveness of miR-7, miR-21, and miR-146a to paclitaxel. *PARP1* expression was elevated in triple-negative cell lines, suggesting a possible association with the molecular subtype. In biopsy samples, miR-7, miR-21, and miR-146a demonstrated predictive potential for pCR in TNBC patients. Analyses of the expression of these miRNAs in samples from the TCGA database showed that miR-146a, alone or in combination with miR-21, was significantly associated with the clinical outcomes of Progression-Free Interval (PFI) and Disease-Specific Survival (DSS). Furthermore, low combined expression of miR-7, miR-21, and miR-146a was associated with a higher risk of disease progression. These findings reinforce the influence of molecular context on chemotherapy response and support the feasibility of miRNA-based signatures as predictive and prognostic tools in triple-negative breast cancer.

Key words: Triple-negative breast cancer (TNBC); microRNAs; *PARP1*; Biomarkers; Pathological Complete Response; paclitaxel; TCGA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa de incidência de câncer entre mulheres no Brasil..	15
Figura 2. Mecanismo de ação dos taxanos	19
Figura 3. Biogênese dos microRNAs	24
Figura 4. Micrografias das linhagens celulares de câncer de mama	29
Figura 5. Expressão relativa basal de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama.....	39
Figura 6. Expressão relativa basal de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo.....	40
Figura 7. Alterações na viabilidade celular induzidas pelo quimioterápico paclitaxel...	41
Figura 8. Expressão de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama após tratamento com paclitaxel.....	42
Figura 9. Expressão relativa basal de <i>PARP1</i> em linhagens celulares de câncer de mama.....	44
Figura 10. Expressão gênica de <i>PARP1</i> em células MCF-7 transfectadas com miR-7 mimic e tratadas com paclitaxel	45
Figura 11 Expressão gênica de <i>PARP1</i> em células MDA-MB-231, transfectada com miR-7 mimic e tratada com paclitaxel	46
Figura 12. Expressão gênica de <i>PARP1</i> em células MDA-MB-436, transfectada com miR-7 mimic e tratada com paclitaxel.....	47
Figura 13. Expressão relativa de miRNAs em amostras FFPE de biópsia de pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo.....	48
Figura 14. Curva ROC do perfil de expressão de miRNAs em pacientes com TNBC..	50
Figura 15. Assinatura de miRNAs como biomarcadores preditivos de Resposta Patológica Completa (pCR) em pacientes com TNBC.....	51
Figura 16. Fluxograma de pacientes selecionadas para análise do banco de dados <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA)	53
Figura 17. Curva ROC do perfil de expressão de miR-146a para o desfecho de Intervalo Livre de Progressão (PFI) em pacientes com TNBC.....	55
Figura 18 Curva ROC do perfil de expressão de miR-146a para o desfecho de Sobrevida Específica da Doença (DSS) em pacientes com TNBC.....	55
Figura 19. Curva ROC dos perfis de expressão de miR-146a e miR-21 para o desfecho de Intervalo Livre de Progressão (PFI) em pacientes com TNBC.....	56

Figura 20. Curva ROC dos perfis de expressão de miR-146a e miR-21 para o desfecho de Sobrevida Específica da Doença (DSS) em pacientes com TNBC.....	57
Figura 21. Curva de Kaplan-Meier do Intervalo Livre de Progressão (PFI) de pacientes com TNBC, estratificadas pela expressão de miR-7, miR-21 e miR-146a	59
Figura 22. Curva de Kaplan-Meier da Sobrevida Específica da Doença (DSS) de pacientes com TNBC, estratificadas pela expressão de miR-146a.....	60
Figura 23. Curva de Kaplan-Meier da Sobrevida Específica da Doença (DSS) de pacientes com TNBC, estratificadas pela expressão de miR-146a e miR-21.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais dos ensaios funcionais com transfecção de miRNA mimic e tratamento com paclitaxel	31
Tabela 2 – Imitadores sintéticos de miRNAs utilizados no estudo	32
Tabela 3 – Primers utilizados nos ensaios de expressão de miRNAs	34
Tabela 4 – Primers utilizados nos ensaios de expressão gênica de <i>PARP1</i>	35
Tabela 5 – Perfil de idade e estadiamento clínico das pacientes - TCGA.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – American Joint Committee on Cancer
ANOVA – Análise de variância
ATCC – American Type Culture Collection
AUC – Area sob a curva
BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro
BER – Base Excision Repair
BRCA1 – Oncogene de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 1
BRCA2 – Oncogene de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 2
cDNA – DNA complementar
Cq – Ciclo de quantificação
DDR – DNA Damage Response
DFS – Sobrevida Livre de Doença
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DSB – Double-Strand Break Repair
DSS – Sobrevida Específica da Doença
ER – Receptor de Estrogênio
FDA – Food and Drug Administration
FFPE – Fixado em formol e emblocado em parafina
HER2 – Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HR – Hazard ratio
HRR – Homologous Recombination Repair
Mimic – Imitador Sintéticos de MicroRNA
MMR – Mismatch Repair
mRNA – RNA mensageiro
MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NER – Nucleotide Excision Repair
NHEJ – Non-Homologous End Joining
NTC – No-template control
OS – Sobrevida Global
PARP1 – Poli(ADP-ribose) polimerase1
pCR – Resposta Patológica Completa
PR – Receptor de Progesterona

PTX – Paclitaxel

RCB – Residual Cancer Burden

ROC – Receiver Operating Characteristic

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real

SCRB – Scramble

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TNBC – Triple-negative breast cancer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Câncer de mama	15
1.1.1.	Câncer de mama triplo-negativo	16
1.2.	Opções terapêuticas para o câncer de mama	17
1.2.1.	Paclitaxel	18
1.3.	Resposta patológica completa	20
1.4.	Biomarcadores	21
1.4.1.	BRCA 1/2	21
1.4.2.	Poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP1)	22
1.4.3.	miRNAs	23
1.4.3.1	miR-7.....	25
1.4.3.2	miR-21.....	25
1.4.3.3	miR-146a.....	26
1.5.	Desfechos clínicos	27
2	OBJETIVOS	28
2.1.	Objetivo geral.....	28
2.2.	Objetivos específicos	28
3	MÉTODOS.....	29
3.1	Linhagens celulares e condições de cultivo	29
3.2	Tratamento com o quimioterápico paclitaxel.....	30
3.3	Curva dose-resposta de paclitaxel pelo método de MTT	30
3.4	Transfecção celular com imitadores sintéticos de miRNAs.....	31
3.5	Amostras clínicas	32
3.5.1	Seleção de pacientes	32
3.5.2	Considerações éticas	33
3.6	Análise da expressão de miRNAs e <i>PARP1</i>	33
3.6.1	Extração, quantificação e análise de pureza das amostras	33
3.6.2	RT-qPCR	34
3.7	Análises de bioinformática.....	36
3.7.1	Predição <i>in silico</i> de genes regulados por miRNAs	36
3.7.2	Extração de dados de amostras do <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA)	36
3.8	Análises estatísticas.....	36
4.	RESULTADOS.....	38

4.1 Análises funcionais <i>in vitro</i> com linhagens celulares de câncer de mama.....	38
4.1.1 Expressão relativa basal de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama.....	38
4.1.2 Alterações na viabilidade celular induzidas pelo quimioterápico paclitaxel.....	40
4.1.3 Expressão de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama em resposta ao paclitaxel.....	42
4.1.4 Expressão basal de <i>PARP1</i> em linhagens celulares de câncer de mama....	43
4.1.5 Expressão de <i>PARP1</i> em resposta à suplementação de miR-7 associada ao paclitaxel.....	44
4.2 miRNAs como biomarcadores preditivos de resposta patológica completa (pCR) no câncer de mama triplo-negativo.....	48
4.2.1 Expressão de miRNAs em biópsias de pacientes com câncer de mama triplo-negativo.....	48
4.2.2 Análise da assinatura de miRNAs como biomarcador preditivo de resposta patológica completa (pCR) em pacientes com TNBC.....	49
4.3 Análise de bioinformática - miRNAs como biomarcadores prognósticos de desfechos clínicos no câncer de mama triplo-negativo.....	52
4.3.1 Seleção de pacientes.....	52
4.3.2 Análises de acurácia de assinaturas de microRNAs, por meio de curvas ROC.....	54
4.3.3 Análise das curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier.....	58
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer é um problema de saúde pública mundial e figura entre as principais causas de morte prematura, com uma estimativa de aumento de 12,6 milhões de novos casos diagnosticados até 2045. O câncer de mama ocupa a segunda posição entre os tipos mais prevalentes no mundo, com 2,3 milhões de casos e mais de 660 mil mortes registradas em 2022 (1). Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama também é a neoplasia mais frequente em mulheres no Brasil, com estimativa de 73.610 casos para cada ano do triênio 2023-2025. Apesar dos avanços científicos e tecnológicos na área de oncologia, neoplasias malignas de mama ainda representam a primeira causa de morte por câncer entre mulheres (2).

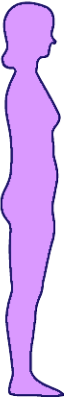
	Localização Primária	Casos	%
	Mama feminina	73.610	30,1%
	Cólon e reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
	Glândula tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Figura 1. Estimativa de incidência de câncer entre mulheres no Brasil. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023, exceto câncer de pele não melanoma (2).

O câncer de mama é uma doença complexa, caracterizada por um elevado grau de heterogeneidade, tanto inter quanto intratumoral, motivo pelo qual tumores morfológicamente semelhantes podem apresentar prognósticos e respostas terapêuticas diversas. Essa heterogeneidade reflete as variações genéticas, epigenéticas e ambientais que influenciam a progressão do tumor e a resposta ao tratamento (3–6).

O tipo histológico de câncer de mama é determinado com base em diversos critérios, incluindo o tipo celular tumoral, aspectos arquiteturais do tecido neoplásico e o perfil imuno-histoquímico. O carcinoma ductal invasivo representa o tipo mais prevalente, correspondendo a aproximadamente 50% a 80% dos casos diagnosticados. Em seguida, destaca-se o carcinoma lobular invasivo, que corresponde a cerca de 5% a 15% dos diagnósticos. Os carcinomas invasivos da mama são classificados em três graus histológicos distintos, com base em uma análise integrada de aspectos morfológicos e citológicos. Essa classificação é realizada por meio de um sistema de pontuação padronizado, sendo os tumores categorizados em grau 1 (bem diferenciados), grau 2 (moderadamente diferenciados) e grau 3 (pouco diferenciados) (7–10).

A caracterização molecular dos tumores de mama, fundamentada na análise de perfis de expressão gênica, tem possibilitado a estratificação clínica da doença em subtipos distintos. A partir da avaliação de biomarcadores clássicos, como os receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e o índice de proliferação celular Ki-67, foi estabelecida a classificação de quatro subtipos moleculares com implicações prognósticas e terapêuticas relevantes: luminal A, luminal B, HER2+ (ou HER2-enriquecido) e basal-like. O câncer de mama triplo-negativo é frequentemente agrupado ao subtipo basal-like, com uma sobreposição média dos perfis de expressão gênica estimada em 56%, podendo essa taxa de sobreposição atingir entre 60% e 90% (10–12).

1.1.1 Câncer de mama triplo-negativo

O câncer de mama triplo-negativo (*Triple-negative Breast Cancer* – TNBC) é considerado um dos principais subtipos de câncer de mama, caracterizado pela ausência dos receptores hormonais de estrogênio e de progesterona, bem como ausência do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Ocorre, predominantemente, em mulheres jovens na pré-menopausa e representa cerca de 15% de todos os casos de câncer de mama. Apresenta um prognóstico desfavorável em comparação a outros subtipos, refletido em uma menor sobrevida global das pacientes, com índice de mortalidade atingindo cerca de 40% nos primeiros cinco anos após o diagnóstico. O subtipo TNBC possui sua própria heterogeneidade,

caracterizada por maiores taxas de mutações somáticas do que as identificadas em outros subtipos, manifestando-se não apenas nas variações biológicas entre os tumores, mas também nas diferentes respostas terapêuticas observadas entre as pacientes (11,13–17).

Após a classificação geral dos tumores de mama, diversas propostas de reclassificação dos subtipos foram desenvolvidas, refletindo a complexidade biológica da doença. Estudos têm demonstrado que o subtipo triplo-negativo constitui um grupo heterogêneo em níveis genéticos e moleculares (16,18). Uma das classificações mais utilizadas atualmente foi proposta por *Lehmann et al.*, dividindo os TNBCs em quatro subtipos tumorais específicos: Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), Mesenquimal (M) e Luminal Androgênico Receptor (LAR), cada um caracterizado por diferenças na idade ao diagnóstico, grau histológico, progressão local e à distância, além de particularidades histopatológicas (19,20).

Devido à escassez de terapias direcionados para este tipo de câncer, a quimioterapia permanece como opção primária de tratamento. Entretanto, grande parte das pacientes ainda sofre com recidiva precoce e disseminação metastática, evidenciando a necessidade de identificar novos alvos moleculares e estratégias terapêuticas capazes de prolongar a sobrevida e melhorar o prognóstico dessas pacientes (21,22).

1.2 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O CÂNCER DE MAMA

As opções de tratamento para o câncer de mama podem combinar terapias locais, como intervenções cirúrgicas e radioterapia, com abordagens sistêmicas abrangendo uma ampla gama de agentes farmacológicos, que podem ser administrados isoladamente ou utilizados em regimes de múltiplos fármacos. A escolha e a combinação dessas modalidades terapêuticas dependem de fatores clínicos, patológicos e moleculares do tumor, bem como das condições clínicas da paciente, visando maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade (18,23).

Entre os quimioterápicos mais utilizados estão as antraciclinas, como doxorrubicina e epirrubicina, os taxanos, como paclitaxel e docetaxel, os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, bem como os agentes da platina, como cisplatina e carboplatina. Dentre os taxanos, o paclitaxel permanece amplamente empregado no tratamento do TNBC, além de ser frequentemente utilizado em ensaios clínicos

voltados à avaliação de terapias multidrogas. A avaliação da sensibilidade dos tumores aos fármacos e a predição de resposta terapêutica são essenciais para a seleção do regime ideal para cada paciente (24–31).

Quando associada a um tratamento local, como cirurgia ou radioterapia, a quimioterapia pode ser empregada antes, denominada de neoadjuvante, ou após estes procedimentos, denominada de adjuvante. A terapia neoadjuvante é mais frequentemente empregada no câncer de mama triplo-negativo do que em outros subtipos, tendo como objetivo primário a redução do volume tumoral para viabilizar a ressecção cirúrgica, resultando em procedimentos menos extensos. Adicionalmente, a resposta ao tratamento neoadjuvante possui valor prognóstico relevante, pois pacientes que alcançam resposta patológica completa apresentam menores taxas de recidiva, enquanto a presença de doença residual significativa ou progressiva está associada a maior risco de recorrência (30,31).

O advento da medicina de precisão inaugurou uma nova era terapêutica, com foco em intervenções personalizadas direcionadas às características moleculares específicas de cada tumor. Em relação aos tumores triplo-negativos, a eficácia da quimioterapia convencional parece ter alcançado um platô. No entanto, avanços nos diagnósticos moleculares têm possibilitado novas estratégias terapêuticas que, em associação à quimioterapia, têm contribuído para melhorias significativas nos desfechos clínicos das pacientes (10,18).

Em pacientes com TNBC portadoras de mutações germinativas ou somáticas em *BRCA1* ou *BRCA2*, a inibição da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) pode induzir a letalidade sintética tumoral. Embora os inibidores de PARP tenham demonstrado eficácia clínica expressiva no tratamento de câncer de ovário associado a mutações em *BRCA*, sua aplicação no contexto do TNBC tem resultado em desfechos clínicos heterogêneos (30).

1.2.1 Paclitaxel

O paclitaxel (PTX) é um quimioterápico integrante da classe dos taxanos, cuja atividade antineoplásica decorre de sua atuação como agente antimicrotúbulo. Esse composto promove a polimerização dos microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina e exerce efeito estabilizador sobre essas estruturas, impedindo sua despolimerização. Como consequência, há interrupção da dinâmica normal de reorganização da rede

microtubular, processo essencial para diversas funções celulares, especialmente durante a fase G2/M do ciclo celular. O paclitaxel também induz alterações estruturais significativas, como a formação anômala de feixes de microtúbulos ao longo do ciclo celular e o surgimento de múltiplos ásteres durante a mitose, culminando na ativação de vias de apoptose e consequente morte celular (32–35) (Figura 2).

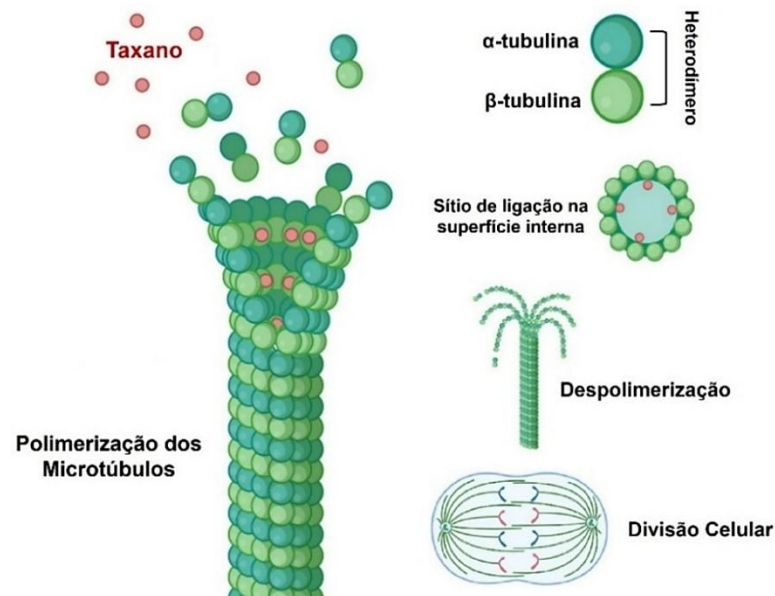


Figura 2. Mecanismo de ação dos taxanos. O paclitaxel liga-se à β -tubulina na face interna dos microtúbulos, estabilizando os protofilamentos e inibindo a despolimerização, comprometendo a mitose e o transporte intracelular. Adaptado de Chmielewski, et al, 2022 (35).

O paclitaxel foi isolado e caracterizado pela primeira vez em 1967, a partir da casca do Teixo-do-Pacífico (*Taxus brevifolia*), por pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, que buscavam extratos vegetais com potencial atividade antineoplásica. Posteriormente, em 1994, esse agente foi aprovado pela agência regulatória norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do câncer de mama, consolidando-se nas décadas seguintes como uma das principais opções terapêuticas utilizadas no manejo de diversos tipos de neoplasias humanas (33,36,37).

Uma das limitações associadas ao uso do paclitaxel refere-se à sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que requer a utilização de veículos contendo substâncias que podem causar efeitos colaterais indesejáveis, exigindo o uso de pré-medicação com corticosteróides, anticolinérgicos e anti-histamínicos. Os eventos

adversos mais frequentemente observados durante o tratamento com paclitaxel estão relacionados à neutropenia, fadiga e a neuropatia periférica (mãos e pés), com sintomas como parestesia, dor, sensação de queimação, formigamento e hipersensibilidade térmica ao frio ou ao calor, impactando significativamente na qualidade de vida dos pacientes (32,34,38,39).

A resistência múltipla a fármacos constitui um obstáculo adicional relevante no contexto da terapêutica oncológica, comprometendo a eficácia do tratamento mesmo em pacientes inicialmente responsivos (37,40).

1.3 RESPOSTA PATOLÓGICA COMPLETA

O critério de avaliação da resposta patológica completa (*Pathological Complete Response* – pCR) pela carga residual de câncer (*Residual Cancer Burden* – RCB) foi desenvolvido por pesquisadores do Hospital MD Anderson, localizado no Texas – EUA. O sistema de estratificação é fundamentado na classificação da resposta tumoral em peças cirúrgicas após o tratamento sistêmico neoadjuvante, utilizando fórmula patenteada com base em critérios da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e do *Food and Drug Administration* (FDA). Os resultados numéricos são estratificados em pCR (resposta completa), RCB-I (doença residual mínima), RCB-II (resposta parcial) ou RCB-III (resistência à quimioterapia), sendo aceita a presença de carcinoma *in situ* residual, sem prejuízo para a classificação de resposta completa (41–46).

Em pacientes com câncer de mama submetidas à terapia neoadjuvante, a resposta patológica completa apresenta associação significativa com desfechos clínicos favoráveis, como o aumento da Sobrevida Livre de Doença e da Sobrevida Global. Essa correlação é particularmente consistente em pacientes diagnosticadas com TNBC, reforçando o papel da resposta terapêutica como um marcador prognóstico robusto para essa população. Entretanto, cerca de dois terços das pacientes com tumores triplo-negativos não atingem a pCR após o tratamento, apresentando pior prognóstico a longo prazo (28,29,31,41,42,47).

Neste cenário, a utilização de biomarcadores moleculares tem se destacado como ferramenta estratégica na identificação precoce de pacientes com potencial benefício frente a abordagens terapêuticas alternativas ou esquemas combinados de tratamento.

1.4 BIOMARCADORES

Biomarcadores, no contexto clínico, são moléculas que apresentam função informativa sobre doenças ou mudanças fisiológicas difíceis de serem observadas diretamente no órgão afetado. Podem ser aplicados na caracterização, diagnóstico e monitoramento de doenças, como indicadores de prognóstico, bem como no desenvolvimento de terapias personalizadas. Com base na crescente compreensão sobre alterações gênicas em doenças complexas, como o câncer, a busca por biomarcadores moleculares mais acurados tornou-se um tema prioritário na pesquisa oncológica (48–52).

Com os avanços da medicina personalizada, diversas pesquisas têm buscado identificar e validar biomarcadores moleculares com valor prognóstico e preditivo. Alterações na expressão gênica e nos perfis de microRNAs têm sido investigadas como potenciais biomarcadores no câncer de mama, tanto em amostras de tecido tumoral, como em biópsias líquidas com amostras de sangue periférico, por meio da análise de DNA tumoral circulante (ctDNA) e células tumorais circulantes (CTCs). Entretanto, painéis multigênicos ainda apresentam custos elevados e, em muitos países, são financeiramente inviáveis. Por esse motivo, novos estudos buscam desenvolver testes diagnósticos e preditivos mais simples e acessíveis, enquanto bases de dados têm sido exploradas como ferramentas complementares para a identificação de potenciais biomarcadores (53–55).

1.4.1 *BRCA1/2*

A instabilidade genômica é uma característica presente na maioria dos tipos de câncer. É desencadeada, principalmente, por alterações cromossômicas e mudanças na estrutura do DNA, sendo considerada um dos principais fatores que contribuem para a sobrevivência, proliferação e disseminação das células tumorais (56,57).

A resposta a danos ao DNA (*DNA Damage Response* – DDR) constitui um dos principais mecanismos celulares para a manutenção da integridade genômica, composta por vias distintas, definidas pelo tipo de lesão processada, porém funcionalmente interligadas. Essas vias atuam de maneira complexa e coordenada, possibilitando o reparo de danos de origem endógena ou exógena (58,59).

As principais vias de reparo do DNA incluem o reparo por excisão de bases

(*Base Excision Repair* – BER), responsável pela correção de quebras de fita simples; o reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair* – NER), que atua sobre nucleotídeos modificados; o reparo de bases mal pareadas ou *mismatch* (*Mismatch Repair* – MMR), que corrige erros de replicação; e o reparo de quebras de dupla fita (*Double-Strand Break* – DSB), subdividido em reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination Repair* – HRR) e junção de extremidades não-homólogas (*Nonhomologous End-Joining* – NHEJ) (60–65).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* atuam como supressores tumorais fundamentais para a manutenção da estabilidade genômica, participando ativamente do reparo de quebras de dupla fita de DNA por meio da via de recombinação homóloga. No contexto do câncer de mama triplo-negativo, estima-se que aproximadamente 50% dos tumores apresentem deficiência nessa via de reparo, independentemente da presença de mutações patogênicas nos genes *BRCA1/2* (61–67).

As mutações no gene *BRCA1* representam frequentemente o principal fator determinante de mutações germinativas, conferindo um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama, estimado entre 50% e 85%, com destaque para a forma triplo-negativa. Esse fenótipo também inclui pacientes com mutações esporádicas em *BRCA1/2*, como aquelas decorrentes de inativação epigenética associada à deficiência nos mecanismos de reparo do DNA, especialmente falhas no processo de recombinação homóloga, o que reforça a complexidade molecular subjacente aos tumores triplo-negativos (63,68).

1.4.2 Poli(ADP-ribose) polimerase-1 (*PARP1*)

A família de poli(ADP-ribose) polimerase humanas (PARPs) é composta por pelo menos 17 proteínas que compartilham um domínio catalítico conservado, responsável pela transferência de unidades de ADP-ribose para proteínas-alvo. Dentre essas, destacam-se as enzimas *PARP1* e *PARP2*, sendo a *PARP1* a principal representante funcional, responsável por aproximadamente 85% a 90% da atividade enzimática total dessa família (69–71).

As enzimas PARP desempenham funções importantes em diversos processos celulares. No mecanismo de reparo do DNA, são fundamentais na detecção de lesões de fita simples e no recrutamento das maquinarias de reparo por excisão de bases. Em células deficientes em *BRCA*, as PARPs, especialmente a *PARP1*, assumem um

papel compensatório como via alternativa de reparo, além de uma estratégia terapêutica, explorando a vulnerabilidade dessas células e potencialmente levando à sua eliminação seletiva (63,67,72–74).

A inibição da PARP impede a correção de lesões no DNA, levando à apoptose celular em virtude da instabilidade genômica característica do ambiente tumoral, fenômeno conhecido como letalidade sintética. No entanto, a resistência a essa estratégia é frequente, com relatos indicando que 30–70% dos pacientes com mutações em genes de reparo do DNA não respondem aos inibidores de PARP (75,76).

1.4.3 miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) constituem uma classe de pequenas moléculas de RNA de fita simples, não codificantes, comumente compreendendo entre 18 e 25 nucleotídeos de comprimento, que desempenham um papel fundamental na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Atuam por meio da ligação direta às regiões não traduzidas localizadas na extremidade 3' (3' UTRs) dos RNAs mensageiros (mRNAs) alvo, promovendo, conseqüentemente, a degradação do mRNA ou a inibição da tradução. Tal mecanismo de regulação refinada da síntese proteica confere aos miRNAs a função de moduladores da expressão gênica, ao invés de atuarem como silenciadores completos (77,78).

Em animais, os microRNAs (miRNAs) são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) como transcritos primários denominados microRNAs primários (pri-miRNAs), os quais adotam uma estrutura característica em forma de grampo de cabelo (*hairpin*). Esses pri-miRNAs são processados no núcleo pelas enzimas Drosha e DGCR8, resultando na formação de microRNAs precursores (pre-miRNAs), que são subsequentemente transportados para o citoplasma pela proteína Exportina-5. No citoplasma, ocorre uma segunda etapa de processamento mediada pela enzima Dicer, em associação com proteínas ligantes de RNA fita dupla, como TRBP ou PACT, culminando na geração de um duplex de miRNA com aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos de comprimento. Em seguida, a fita passageira (sentido) é degradada, enquanto a fita guia (antisense), correspondente ao miRNA maduro, é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês RNA-induced silencing complex). Dentro do RISC, as proteínas Argonauta desempenham um papel central

na orientação do complexo para os RNAs mensageiros (mRNAs) alvo que contêm sequências parcialmente complementares nas regiões não traduzidas de extremidade 3' (3' UTRs). Essa interação promove o silenciamento gênico por meio da repressão traducional ou da desestabilização do mRNA (79–82).

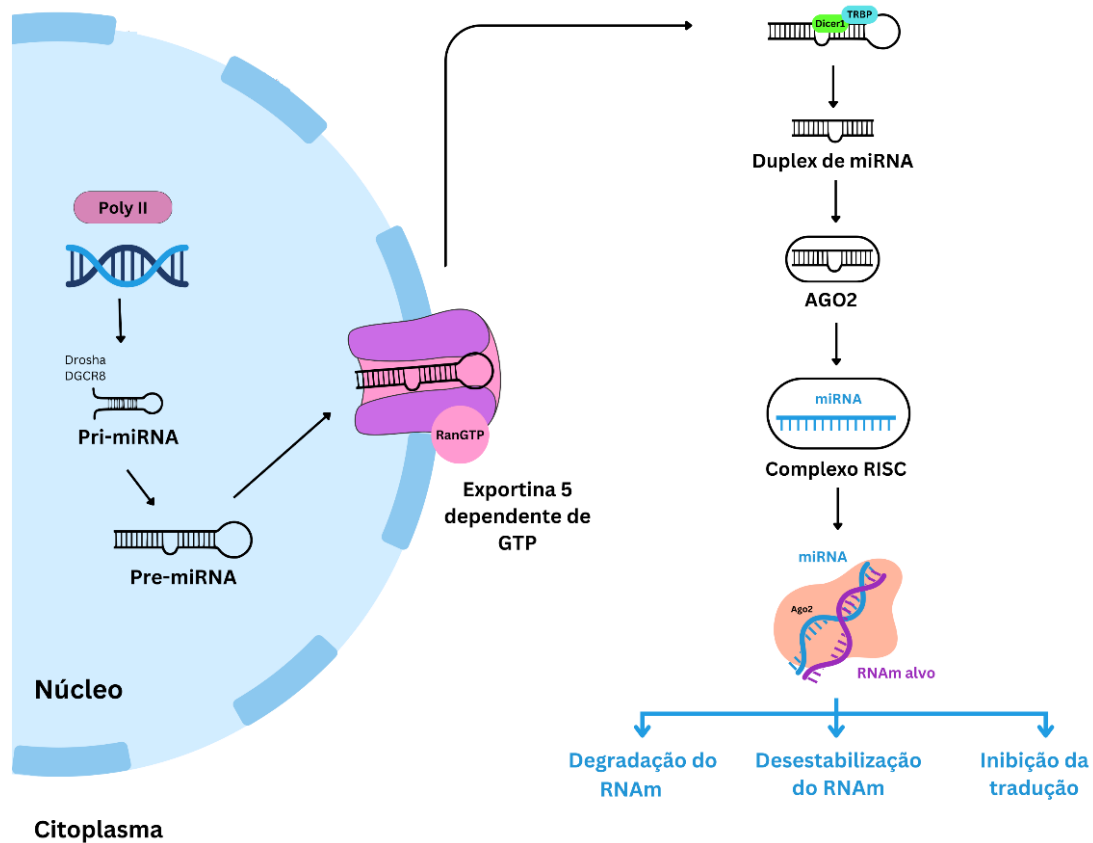


Figura 3. Biogênese dos microRNAs. Adaptado de Kalkusova, K. et al (2022) (83).

Evolutivamente conservados em uma ampla variedade de organismos, os miRNAs correspondem a aproximadamente 1% do genoma humano e exercem controle pós-transcricional sobre mais de um terço dos genes codificadores de proteínas. Sua expressão desregulada tem sido amplamente associada à patogênese de diversas doenças, especialmente no câncer, contribuindo para carcinogênese, progressão tumoral, morte celular e resistência a quimioterápicos (80,84,85).

Os miRNAs têm se destacado como potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos no câncer de mama. A desregulação de sua expressão no contexto tumoral sustenta seu uso na detecção precoce, na classificação molecular e no direcionamento terapêutico. Perfis específicos de miRNAs têm demonstrado

capacidade de distinguir, de forma consistente, tecidos neoplásicos de seus equivalentes normais (82,86,87). A compreensão detalhada dos mecanismos regulatórios dos microRNAs é essencial para a identificação de novos alvos diagnósticos e terapêuticos.

1.4.3.1 *miR-7*

O microRNA *miR-7* é altamente conservado ao longo da evolução, sendo codificado por três genes distintos no genoma humano: *miR-7-1*, *miR-7-2* e *miR-7-3*, localizados nas regiões cromossômicas 9q21, 15q26 e 19q13, respectivamente. Embora apresentem diferenças nas sequências precursoras, todos esses *loci* originam a mesma sequência madura funcional, predominantemente na forma de *miR-7-5p*, considerada a principal fita guia. Essa conservação estrutural reforça sua importância funcional nos processos celulares regulados por microRNAs (77,88,89).

Inicialmente identificado por Lagos-Quintana e Tuschl em 2001 e, desde então, sua função como regulador negativo da tumorigênese tem sido amplamente estudada. No contexto do câncer de mama, o *miR-7* tem sido descrito como um importante supressor tumoral, inibindo a capacidade invasiva e o potencial tumorigênico por meio da regulação negativa da quinase ativada por p21 (PAK). Além disso, sua atuação envolve a indução de apoptose, a inibição da proliferação celular e a supressão da transição epitelial-mesenquimal (EMT), um processo fundamental para a aquisição de características invasivas e metastáticas pelas células tumorais (90–92).

O *miR-7* tem sido amplamente investigado como potencial biomarcador prognóstico no câncer de mama, com base na avaliação de sua expressão intratumoral. Apesar das evidências que apontam para uma função supressora de *miR-7*, sua aplicabilidade clínica enquanto marcador prognóstico permanece incerta e frequentemente controversa, o que reflete a complexidade dos mecanismos moleculares que modulam a resposta terapêutica e a progressão tumoral (89,93–95).

1.4.3.2 *miR-21*

O microRNA *miR-21* possui relevância funcional na regulação de diversas vias de sinalização celular, atuando como modulador em processos inflamatórios e na resposta imune. A expressão aberrante de *miR-21* tem sido frequentemente relatada

em múltiplos tipos de câncer, incluindo tumores de pulmão, mama e colorretal. Sua superexpressão está associada à promoção do crescimento tumoral, à infiltração dos tecidos adjacentes e à disseminação metastática, contribuindo assim para a progressão e agressividade da doença (96,97).

No contexto do câncer de mama, o miR-21 destaca-se como um dos miRNAs mais amplamente investigados, estando correlacionado com características tumorais agressivas, como estágio clínico avançado e elevado grau histológico. Sua expressão é positivamente regulada pelo Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) e frequentemente encontrado superexpresso em tecidos tumorais de mama. Além disso, miR-21 regula negativamente o gene supressor tumoral PTEN, cuja inibição resulta na ativação da via PI3K/AKT, favorecendo a sobrevivência celular, proliferação e resistência terapêutica. Essa desregulação contribui significativamente para a progressão tumoral e pior prognóstico clínico (86,98–101). Sua ação multifuncional reflete a complexa interação entre reguladores moleculares e a fisiologia do câncer, com efeitos que variam conforme o contexto biológico.

1.4.3.3 *miR-146a*

O câncer de mama destaca-se entre os diversos tipos de câncer por apresentar o maior número de publicações científicas que evidenciam a participação funcional do miR-146a. Entretanto, os achados são contraditórios quanto aos mecanismos moleculares mediados por esse miRNA. O miR-146a é frequentemente citado como superexpresso em tumores triplo-negativos, estando essa superexpressão associada a características fenotípicas mais agressivas, como aumento da capacidade de invasão e migração celular (102). Do ponto de vista mecanístico, o miR-146a parece regular negativamente genes supressores tumorais, como o *BRCA1*, ao mesmo tempo em que induz a expressão de genes pró-metastáticos, incluindo MMP2, MMP9 e CXCR4. Esse padrão de regulação é particularmente observado em células MDA-MB-231, contribuindo para o fenótipo agressivo associado a essa linhagem tumoral (103,104).

Por outro lado, evidências indicam que, em pacientes com câncer de mama triplo-negativo, a baixa expressão de miR-146a constitui um preditor eficaz de pior prognóstico, estando associada à redução da sobrevida, ao aumento do risco de recorrência tumoral e à maior incidência de metástases (105,106).

Apesar do potencial biológico promissor, a aplicabilidade clínica do miR-146a no câncer de mama triplo-negativo ainda permanece insuficientemente explorada.

1.5 DESFECHOS CLÍNICOS

Desfechos clínicos constituem variáveis ou eventos mensuráveis empregados para avaliar os efeitos de uma intervenção em saúde, seja ela de natureza preventiva, diagnóstica ou terapêutica. Esses desfechos refletem o impacto direto de uma condição clínica ou de um tratamento sobre a saúde do paciente, abrangendo indicadores como mortalidade, progressão da doença, incidência de eventos adversos e qualidade de vida (107–109).

A Sobrevida Específica da Doença (*Disease-Specific Survival* – DSS) é definida como o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o óbito causado especificamente pela doença em estudo, desconsiderando mortes por outras causas. Em pesquisas relacionada ao câncer de mama, também é denominada por alguns autores de Sobrevida Específica do Câncer de Mama (*Breast Cancer-Specific Survival* – BCSS). Por refletir exclusivamente os óbitos relacionados ao câncer de mama, esse desfecho pode ser mais sensível e informativo do que a Sobrevida Global (*Overall Survival* – OS) em estudos voltados à identificação de biomarcadores prognósticos e de resposta terapêutica (108,110–112).

O Intervalo Livre de Progressão (*Progression-Free Interval* – PFI) é um desfecho clínico que se refere ao tempo decorrido entre o diagnóstico inicial da doença em estudo, ou do final do tratamento primário, até a ocorrência de recidiva, progressão ou morte relacionada à doença. Diferente da Sobrevida Livre de Progressão (*Progression-Free Survival* – PFS), o PFI exclui mortes por causas não relacionadas à doença em estudo, sendo especialmente útil em estudos que avaliam o comportamento biológico do tumor e a eficácia de biomarcadores prognósticos (113,114).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de miRNAs e *PARP1* em linhagens celulares de câncer de mama e amostras de pacientes com câncer de mama triplo-negativo, como biomarcadores preditivos de resposta terapêutica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar miRNAs diferencialmente expressos entre linhagens celulares de câncer de mama hormônio-positiva e triplo-negativas;
- b) Avaliar se o perfil de expressão dos miRNAs selecionados sofre alteração em resposta ao tratamento com o quimioterápico paclitaxel;
- c) Avaliar se a modulação do conteúdo de miR-7 nas linhagens celulares é capaz de regular a expressão gênica de *PARP1*;
- d) Analisar a expressão de miRNAs em biópsias de pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo e sua associação com a Resposta Patológica Completa (pCR);
- e) Realizar análises *in silico* de dados de pacientes com câncer de mama triplo-negativo para identificar associações entre características moleculares e desfechos clínicos.

3 MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas três linhagens celulares de adenocarcinoma mamário humano: i) MCF-7 (ATCC® HTB-22), subtipo Luminal - positiva para receptores hormonais (RH+); ii) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26), subtipo triplo-negativa, *BRCA1* competente; MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130), subtipo triplo-negativa, *BRCA1* mutado (Figura 1). As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e a MDA-MB-436 foi adquirida da American Type Culture Collection – ATCC.

A linhagem MCF-7 foi cultivada em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com HEPES (10 mM); D-glicose (2,5 g/L); Bicarbonato de Sódio (2 g/L); Piruvato de Sódio (1 mM); 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), mantida em estufa com atmosfera úmida a 37° C e 5% de CO₂. A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio L-15 (Leibovitz) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), mantida em estufa com atmosfera úmida a 37° C, na ausência de CO₂. A linhagem MDA-MB-436 foi cultivada em meio L-15 (Leibovitz) (Sigma-Aldrich), suplementado insulina (10 µg/mL); glutathione (16 µg/mL); com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), mantida em estufa com atmosfera úmida a 37° C, na ausência de CO₂.

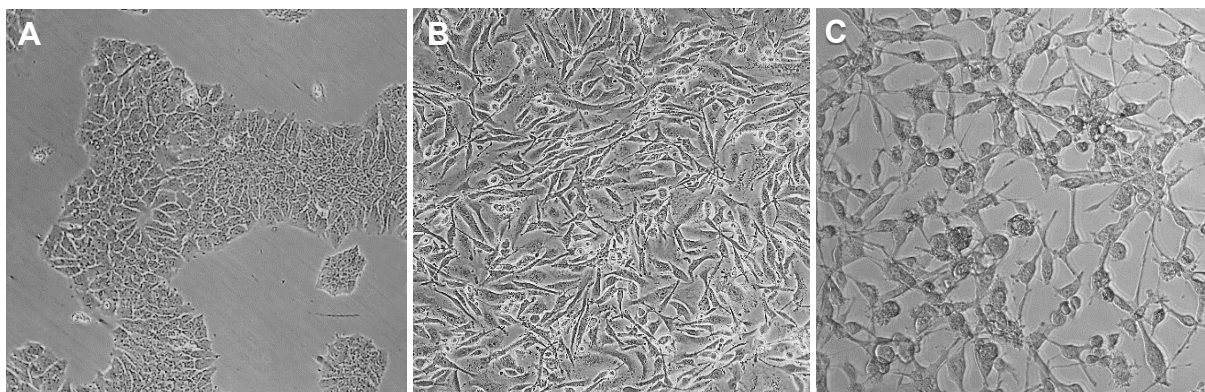


Figura 4. Micrografias das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas no estudo. A) MCF-7; B) MDA-MB231; C) MDA-MB-436. Imagens capturadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100), com aumento de 20X.

As células foram previamente cultivadas em frascos de 25 cm² ou 75 cm² até a confluência de 70-90%. No início de cada ensaio, as células foram lavadas com tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) (Laborclin Ltda.) e desaderidas dos frascos de cultivo com o auxílio de Tripsina/EDTA 0,25% (Gibco) para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 ou de um *cell scraper*, para a linhagem MDA-MB-436. Foram transferidas para tubos de polipropileno, centrifugadas a 1500 RPM por 3 minutos, ressuspensas em PBS e contadas na Câmara de Neubauer. O número de células viáveis orientou o cálculo da quantidade de células utilizada em cada ensaio.

3.2 TRATAMENTO COM O QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL

No presente estudo foi utilizado o medicamento Ontax (Libbs Farmacêutica Ltda.) para os ensaios funcionais com linhagens celulares de câncer de mama. Trata-se de solução injetável, contendo 6,0 mg/mL de paclitaxel (PTX) e os excipientes óleo de rícino etoxilado, ácido cítrico e álcool etílico.

A partir da solução original, na concentração de 7 mM, foram feitas diluições seriadas em água ultrapura no momento da utilização, resultando em uma solução de trabalho na concentração de 7 µM. Por fim, a solução de trabalho foi diluída, em meio de cultura específico para cada linhagem, na concentração especificada para cada ensaio.

Os ensaios de viabilidade celular em placas de 96 poços foram executados com volume final de 200 µL/poço, enquanto os ensaios de expressão gênica foram realizados em placas de 06 poços com volume final de 3 mL/poço. Volumes idênticos de meio de cultura foram adicionados aos poços dos grupos que não receberam o tratamento com PTX. Para ensaios de qPCR, os pellets das células foram recolhidos 24h ou 48h após o tratamento com PTX e o RNA total ou miRNA foram extraídos, de acordo com a necessidade de cada ensaio.

3.3 CURVA DOSE-RESPOSTA DE PACLITAXEL PELO MÉTODO DE MTT

Nos ensaios de dose-resposta para determinação da concentração inibitória do quimioterápico paclitaxel, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), com base na habilidade das células metabolicamente ativas de reduzirem os sais de

tetrazolium (amarelo) ao produto formazan (púrpura), pela ação de desidrogenases mitocondriais.

Em placas de poliestireno de 96 poços, foram plaqueadas de 5×10^3 a 7×10^3 células por poço, mantendo-se as condições de cultivo por 24 horas. Após aderência das células, foi realizado o tratamento com paclitaxel a 100 nM. Transcorridas 24 ou 48 horas do tratamento, o conteúdo dos poços foi substituído por 150 μ L de meio de cultura contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após incubação por 2 a 3 horas em estufa umidificada a 37°C, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados em 150 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores de absorbância foram determinados com o auxílio de um leitor de placas (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Scientific), utilizando o comprimento de onda de 595 nm e convertidos em porcentagem de viabilidade em relação ao valor obtido no grupo controle sem tratamento (NT).

3.4 TRANSFEÇÃO CELULAR COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MIRNAS

Os ensaios funcionais com imitadores sintéticos de miRNAs (*mimics*), avaliados isoladamente ou em associação com o paclitaxel, foram conduzidos com base nos grupos experimentais detalhados na tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais dos ensaios funcionais com transfecção de miRNA *mimic* e tratamento com paclitaxel

Grupo	Sigla	Condições experimentais
I	CV	Controle Veículo. Meio de cultura + reagente de transfecção
II	miR-7	Transfecção com miR-7 <i>mimic</i> 1 nM ou 10 nM
III	miR-7 + PTX	Transfecção com miR-7 <i>mimic</i> 1 nM ou 10 nM + tratamento com paclitaxel 100 nM
IV	SCRB	Transfecção com <i>mimic</i> controle negativo - <i>scramble</i> 1 nM ou 10 nM
V	SCRB + PTX	Transfecção com <i>mimic scramble</i> 1 nM ou 10 nM + tratamento com paclitaxel 100 nM
VI	PTX	Tratamento com paclitaxel 100 nM

A transfecção foi realizada com as células em confluência de 30-50%, conforme recomendações do fabricante do reagente de transfecção INTERFERin (Polyplus-transfection), que consiste em um polímero catiônico em solução hidroalcolica,

desenvolvido para oferecer alta eficiência de transfecção com baixas concentrações de miRNA. Os oligonucleotídeos utilizados foram miR-7 mimic (hsa-miR-7-5p miRCURY LNA miRNA Mimic, Qiagen) e mimic Controle Negativo - Scramble (Negative Control miRCURY LNA miRNA Mimic), conforme tabela 2. Os produtos liofilizados foram dissolvidos em água *nuclease-free* e aliquotados na concentração estoque de 10 μ M.

Tabela 2 – Imitadores sintéticos de miRNAs utilizados no estudo

Imitador sintético	Sequência da fita guia (<i>guide strand</i>)	Fabricante
hsa-miR-7a-5p	5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU-3'	Qiagen
<i>Scramble</i>	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'	Qiagen

Em placas de poliestireno de 06 poços, foram plaqueadas de 5×10^3 a 7×10^3 células por poço, mantendo-se as condições de cultivo por 24 horas. Após aderência das células, foram realizadas as transfecções com miR-7 ou Scramble mimic na concentração de 1nM ou 10 nM e, 24 horas após a transfecção, realizou-se o tratamento com paclitaxel a 100 nM. Transcorridas 24 ou 48 horas do tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e os pellets encaminhados imediatamente para extração de miRNAs ou RNA total.

3.5 AMOSTRAS CLÍNICAS

3.5.1 Seleção de pacientes

Para análise do perfil de miRNAs como potencial preditor de resposta terapêutica, foram utilizadas amostras de biópsias fixadas em formol e emblocadas em parafina (FFPE) de pacientes do sexo feminino com diagnóstico de câncer de mama, subtipo molecular triplo-negativo, atendidas no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) e no Centro de Câncer de Brasília (CETTRO). Foram formados dois grupos para avaliação comparativa dos resultados: Grupo I (pCR) – Pacientes que alcançaram a resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante; Grupo II (NpCR) – Pacientes que não alcançaram a resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante.

Como critério de inclusão, foram selecionadas pacientes com câncer de mama triplo-negativo, identificadas por exame imunohistoquímico em seu diagnóstico por profissionais qualificados, no período de 01/2016 a 12/2021 e com idades entre 18 e 79 anos. Foram excluídas pacientes sem dados clínicos bem descritos em prontuário médico e pacientes cujo bloco de parafina estivesse sem possibilidade de avaliação analítica.

As amostras de biópsia foram seccionadas dos blocos de parafina por profissionais qualificados, com o auxílio de um micrótomo. Para cada amostra, foram executados quatro cortes com espessura de 10 µm, destinados às análises moleculares, e cortes de 5 µm destinados às análises histopatológicas, realizadas por um médico patologista colaborador.

3.5.2. Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CAAE: 52424221.7.0000.0030) e do Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal (IGESDF), gestor do Hospital de Base do DF (CAAE: 46115121.6.0000.8153). Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes do início das análises.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MIRNAS E *PARP1*

Para a análise da expressão gênica de *PARP1* e do perfil de expressão de miRNAs em linhagens celulares e biópsias de pacientes, foram utilizadas as metodologias e reagentes citados a seguir.

3.6.1 Extração, quantificação e análise de pureza das amostras

Para a execução dos ensaios de expressão de miRNAs de linhagens celulares, foram realizadas extrações de pellets celulares com o *kit mirVana miRNA Isolation* (Applied Biosystems). Para os ensaios de expressão gênica de *PARP1*, o RNA total foi extraído dos pellets com o *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen). Para as amostras de biópsias, a extração foi realizada com o *kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit*

for FFPE (Invitrogen), com dois cortes de 10 µm compondo cada amostra.

As quantificações foram realizadas pelo método fluorométrico, utilizando os reagentes *Qubit microRNA Assay Kit* (Invitrogen) para miRNAs e *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen) para RNA total, em tubos translúcidos específicos para este fim e leitura no equipamento *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen). A pureza das amostras foi aferida por espectrofotometria com *NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

3.6.2 RT-qPCR

Para a realização da transcrição reversa (RT), seguida de PCR em tempo real (qPCR), as amostras previamente quantificadas foram diluídas em água *RNAse-free* nas concentrações determinadas para cada ensaio, visando a padronização dos resultados.

Nos ensaios de expressão de miRNAs, tanto em linhagens celulares quanto em amostras clínicas, a síntese de cDNA foi realizada com o *kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) e a qPCR com o reagente *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems), juntamente com iniciadores específicos (*primers*) dos miRNAs em estudo (*TaqMan MicroRNA Assay* - Applied Biosystems), conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – *Primers* utilizados nos ensaios de expressão de miRNAs

Nome do ensaio	ID do ensaio	Sequência do miRNA maduro
hsa-miR-7	005723_mat	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU
hsa-miR-21	000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-146a	000468	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-671	197646_mat	AGGAAGCCCUGGAGGGGCUGGAG
hsa-miR-19b	000396	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA

Nos ensaios de expressão gênica de *PARP1*, a síntese de cDNA foi realizada com o *kit SuperScript First-Strand Synthesis System* (Applied Biosystems) e a qPCR com *Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções

do fabricante. As informações referentes aos *primers* utilizados nesta etapa, bem como as sequências, estão detalhadas na tabela 4.

Tabela 4 – *Primers* utilizados nos ensaios de expressão gênica de *PARP1*

Gene	Sequência	Fabricante
<i>PARP1</i>	For.: 5'-GAGTGGATGAAGTGGCGAAG-3' Rev.: 5'-CAGGTCGTTCTGAGCCTTTAG-3'	Invitrogen
<i>GAPDH</i>	For.: 5'-CTCCTGTTCGACAGTCAGCC-3' Rev.: 5'-CCCAATACGACCAAATCCGTTG-3'	Invitrogen
<i>GPB1</i>	For.: 5'-TCACTTGAGGCAGAACACAGA-3' Rev.: 5'-AGCACATGTTTCCATTTTCAC-3'	Sigma

As placas de 96 poços com as reações de qPCR foram seladas com filme adesivo (*MicroAmp Optical Adhesive Film*, *Applied Biosystems*), centrifugadas (*Mini Plate Spinner*, Labnet) e levadas ao termociclador *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System*, (*Applied Biosystems*) seguindo os tempos e temperaturas específicos, de acordo com as instruções dos fabricantes de cada reagente.

Cada ensaio foi realizado com amostras em triplicata técnica, incluindo-se um miRNA/RNA de referência para normalização dos resultados e um controle negativo NTC (*no-template control*) contendo os demais reagentes, porém com água *nuclease-free* em substituição ao cDNA. O gene de referência ou miRNA calibrador foi escolhido com base em ensaios prévios, onde o critério de escolha foi a expressão mais estável entre os grupos controle e os grupos submetidos à transfecções e/ou tratamentos. Os resultados foram avaliados com base na média dos valores dos ciclos de quantificação de cada amostra (Ct ou Cq) e a expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Os dados foram inicialmente normalizados pela variação do Cq do miRNA alvo em relação ao Cq do RNA de referência, obtendo-se o ΔCq . O valor de ΔCq de cada grupo experimental foi posteriormente comparado com o ΔCq do grupo controle, obtendo-se o $\Delta\Delta Cq$. Este valor de $\Delta\Delta Cq$ foi utilizado para cálculo da expressão relativa, mediante a fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ que contempla a expressão logarítmica por duplicação do cDNA a cada ciclo de amplificação, e o sinal negativo que ajusta a relação inversa entre o valor de Cq e o conteúdo de miRNA na amostra em teste.

3.7. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

3.7.1. Predição *in silico* de genes regulados por miRNAs

A seleção *in silico* de potenciais alvos dos miRNAs em estudo foi feita inicialmente por meio da base de dados miRBase e pelas ferramentas de predição TargetScanHuman, v. 8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/) e miRTarBase, v. 9.0 (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php). A informação concordante de pelo menos duas bases de dados foi adotada como etapa de filtro para a seleção dos potenciais genes alvo.

3.7.2. Extração de dados de amostras do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)

Por meio do portal UCSC Xena Browser (<https://xena.ucsc.edu/>), foram extraídos dados de expressão de miRNAs maduros (miR-7, miR-21 e miR-146a) e informações clínico-patológicas de amostras de câncer de mama do banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA-BRCA). Os dados de expressão foram obtidos por *miRNA-Seq* (IlluminaSeq), normalizados e expressos em escala logarítmica ($\log_2 \text{RPM} + 1$). Os critérios utilizados na seleção das pacientes para obtenção da coorte de estudo estão detalhados na figura 16.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram previamente avaliados quanto à distribuição, por meio do teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. Dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por meio dos testes paramétricos *t* de *Student* não pareado ou ANOVA de uma via, seguidos pelo teste de Tukey. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, empregou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Dados paramétricos foram expressos como média e erro padrão e os não paramétricos como mediana e intervalo interquartil. Os resultados de expressão de miRNAs, obtidos por qPCR ou a partir do banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), foram analisados quanto à sensibilidade, especificidade e acurácia por meio da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), sendo o ponto de corte (*cut-*

off) determinado com base no Índice de Youden (J). Este índice, calculado pela fórmula $J = \text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 1$, representa a máxima eficácia diagnóstica, identificando o ponto ótimo da curva ROC que maximiza a discriminação entre grupos. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier, e a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste log-rank (Mantel-Cox). A magnitude da associação foi expressa como *hazard ratio* (HR), acompanhado do intervalo de confiança de 95% (IC95%). O nível de significância considerado em todas as análises foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 10.

4 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir estão organizados em três tópicos principais. O primeiro (4.1) aborda os resultados funcionais *in vitro* obtidos a partir de linhagens celulares de câncer de mama. O segundo (4.2) reúne os dados gerados em nosso laboratório referentes ao perfil de expressão de miRNAs em biópsias de pacientes com câncer de mama triplo-negativo. Por fim, o terceiro tópico (4.3) contempla as análises *in silico* realizadas com dados de pacientes disponibilizados pelo consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

4.1. ANÁLISES FUNCIONAIS *IN VITRO* COM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

4.1.1. Expressão relativa basal de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama.

Inicialmente, procurou-se investigar as diferenças no perfil de expressão basal dos microRNAs miR-7, miR-21, miR-671 e miR-146a entre uma linhagem de câncer de mama hormônio-positiva, MCF-7, e as linhagens triplo-negativas, uma competente para *BRCA1* (*BRCA1*⁺), MDA-MB-231, e outra com *BRCA1* mutado (*BRCA1*⁻), MDA-MB-436. Conforme mostra a figura 5A, foi identificada diferença significativa no perfil de expressão dos três miRNAs avaliados nas linhagens triplo-negativas, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, em relação à linhagem hormônio-positiva, MCF-7. Na linhagem MDA-MB-231, foram observadas reduções na expressão relativa de miR-7, miR-21 e miR-671 para 0,07; 0,18 e 0,30 respectivamente, em comparação à expressão observada na linhagem em MCF-7, definida como 1 ou 100%. De forma semelhante, na linhagem MDA-MB-436, os valores de expressão relativa de miR-7, miR-21 e miR-671 foram de 0,05; 0,12 e 0,28, respectivamente. Por outro lado, observou-se um aumento acentuado na expressão relativa de miR-146a em ambas as linhagens triplo-negativas. Na linhagem MDA-MB-231 o aumento foi de 2.954 vezes, já na linhagem MD-MB-436 o aumento na expressão desse miRNA foi 450 vezes, em relação à expressão em MCF-7 (Figura 5B).

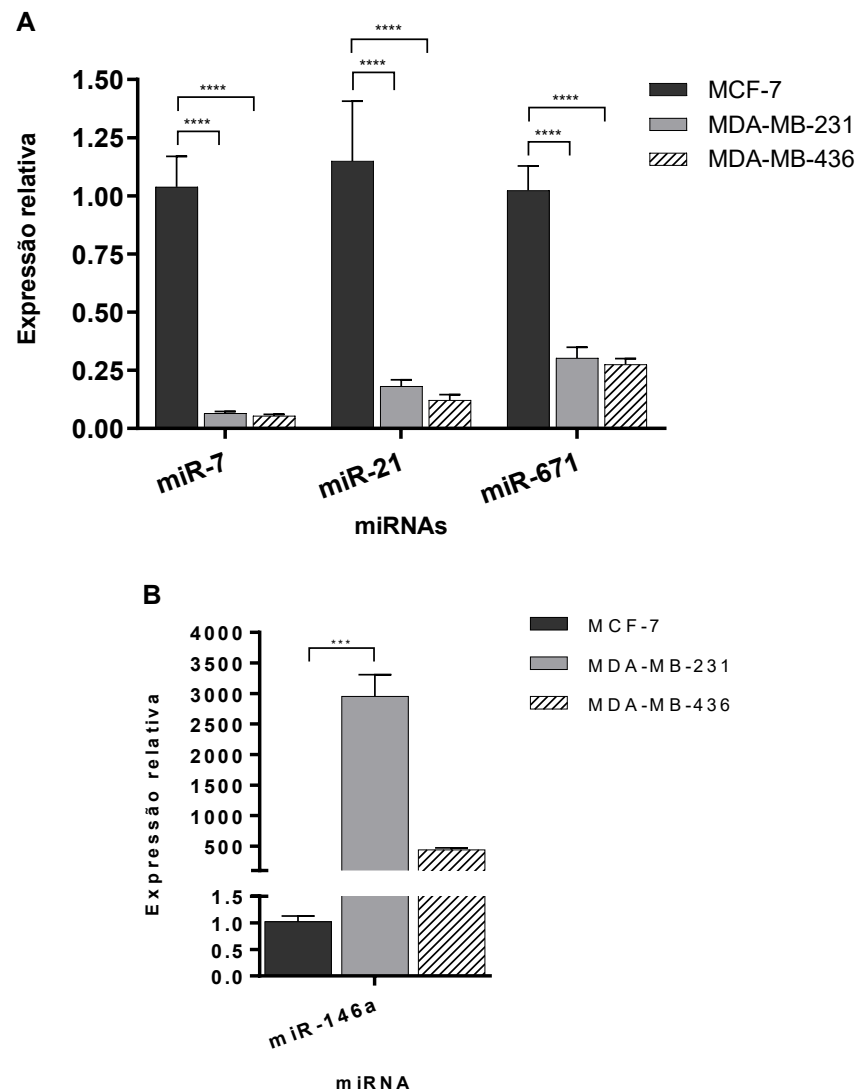


Figura 5. Expressão relativa basal de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama. Em relação à linhagem hormônio-positiva MCF-7, as linhagens triplo-negativas MDA-MB-231 e MDA-MB-436 apresentaram expressão significativamente menor de miR-7 (0,07 e 0,05), miR-21 (0,18 e 0,12) e miR-671 (0,30 e 0,28), respectivamente (A). Já miR-146a se mostrou 2.954 vezes mais expresso na linhagem MDA-MB-231 e 450 vezes mais expresso na linhagem MDA-MB-436 (B). Ensaio de RT-qPCR, normalizados pelo miRNA de referência miR-19b. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e analisada pelo teste de Mann-Whitney. N = 6 amostras por tipo celular. Diferenças significativas em relação à linhagem MCF-7. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Na avaliação comparativa entre as duas linhagens triplo-negativas, MDA-MB231 e MDA-MB436, não houve diferença significativa na expressão de miR-7, miR-21 e miR-671. Por outro lado, a expressão relativa de miR-146a observada na linhagem com mutação no gene *BRCA1*, MDA-MB-436, foi significativamente menor, 0,15 vezes em relação à linhagem *BRCA1* competente, MDA-MB-231 (Figura 6).

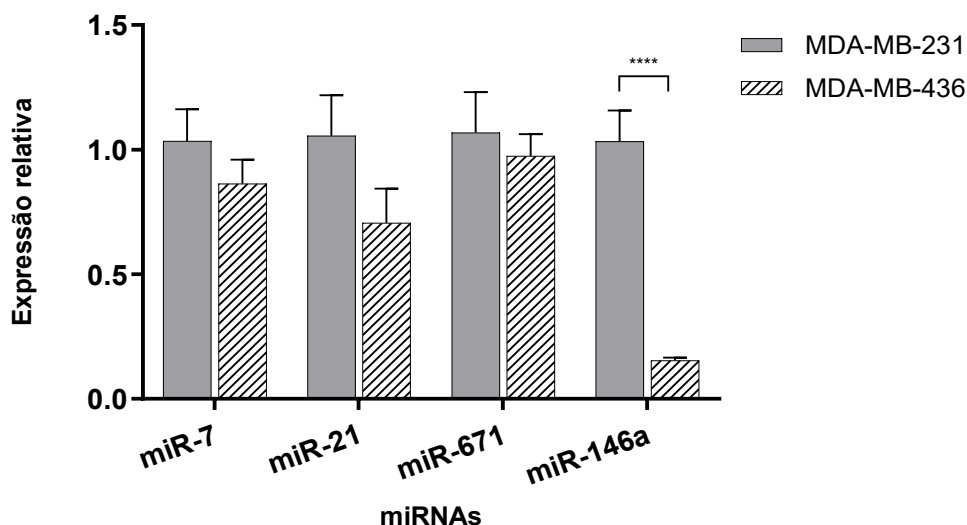


Figura 6. Expressão relativa basal de miRNAs entre linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo. miR-146a mostrou uma diminuição na expressão relativa na linhagem MDA-MB-436, comparativamente à linhagem MDA-MB-231 (0,15 vezes). Entretanto, não foi observada diferença significativa na expressão de miR-7, miR-21 e miR-671 entre as duas linhagens. Ensaios de RT-qPCR, normalizados pelo miRNA de referência miR-19b. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e analisada pelo teste de Mann-Whitney. n=6. **** p< 0,0001.

4.1.2. Alterações na viabilidade celular induzidas pelo quimioterápico paclitaxel.

Em seguida, foi feita a avaliação dos efeitos do quimioterápico paclitaxel (PTX) sobre a viabilidade celular das linhagens triplo-negativas em estudo, MDA-MB-231 e MDA-MB-436. Para isso, foram realizados ensaios pelo método de MTT, com as seguintes concentrações de PTX: 3,75 nM; 7,5 nM; 15 nM; 30 nM; 60 nM; 120 nM; 240 nM; 480 nM e 960 nM.

Na linhagem MDA-MB-231, a menor concentração capaz de promover uma redução significativa da viabilidade celular, em relação ao grupo não tratado, foi a concentração de 60 nM, com redução para 87,3% de viabilidade. A concentração mais eficaz observada nesta linhagem foi a de 480 nM, reduzindo a viabilidade para 72,1%. Houve uma discreta recuperação da viabilidade celular para 86,3% na concentração de 960 nM (Figura 7A).

A linhagem MDA-MB-436 demonstrou maior sensibilidade ao PTX. A menor concentração com capacidade de reduzir a viabilidade celular de forma significativa, em relação ao grupo sem tratamento, foi a concentração de 30 nM, com redução para 75,2%. A concentração mais eficaz nesta linhagem foi de 960 nM, promovendo uma redução da viabilidade celular para 46,9%, demonstrando um efeito dose-dependente do quimioterápico (Figura 7B).

Os resultados obtidos confirmaram que o paclitaxel promoveu uma redução significativa na viabilidade celular em comparação ao grupo controle não tratado (NT), nas duas linhagens triplo-negativas analisadas, demonstrando sua adequação como modelo *in vitro* para os testes de hipótese propostos a seguir.

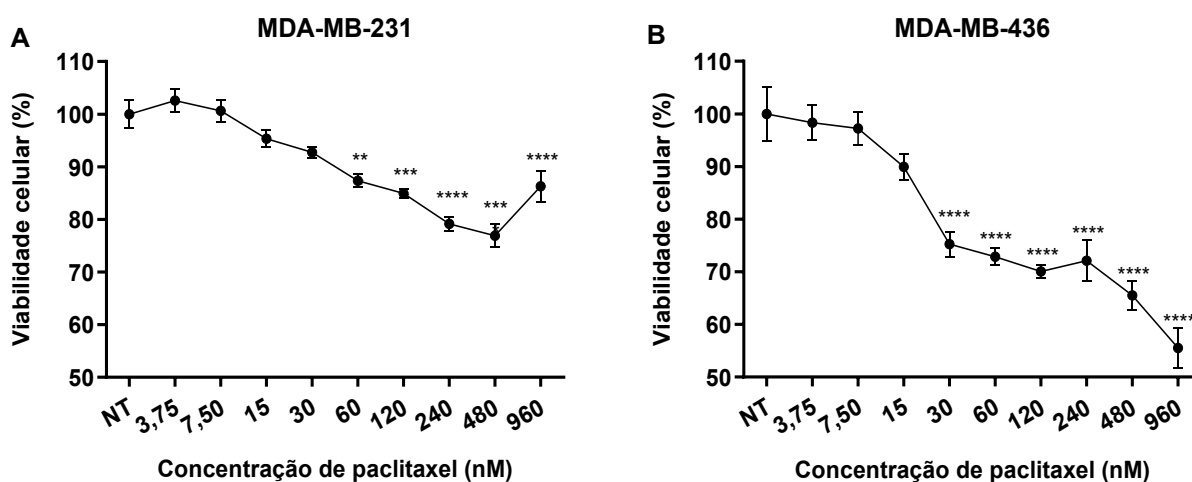


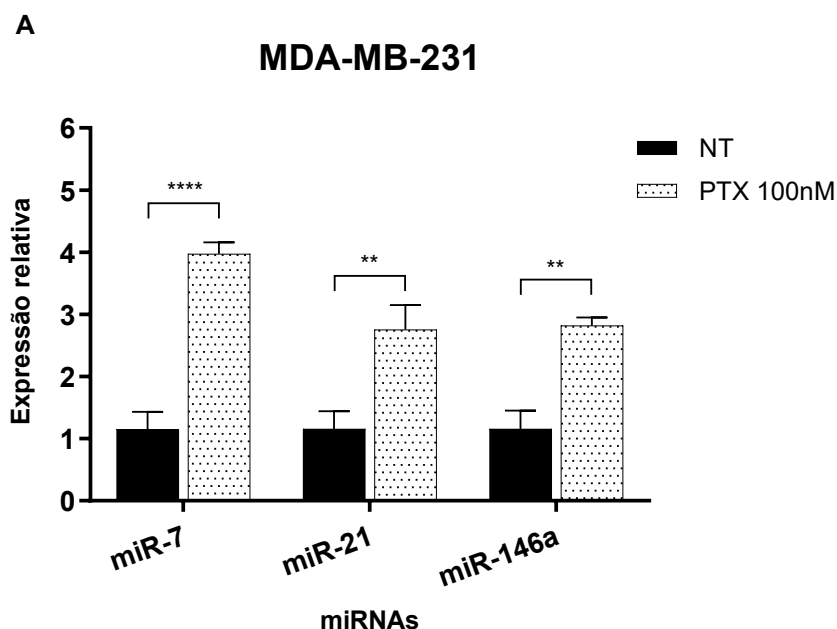
Figura 7. Alterações na viabilidade celular induzidas pelo quimioterápico paclitaxel, em linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo, avaliadas pelo método de MTT. Nas duas linhagens avaliadas houve redução significativa na viabilidade celular, em relação ao grupo não tratado (NT). Na linhagem MDA-MB-231, a menor concentração significativamente eficaz foi de 60 nM (87,3% de viabilidade) e o maior efeito foi observado em 480 nM (72,1%) (A). Na linhagem MDA-MB-436, a menor concentração eficaz foi 30 nM (75,2 % de viabilidade), com maior efeito observado em 960 nM (46,9%) (B). Três ensaios independentes, com 4 replicatas cada. Resultados convertidos em porcentagem de viabilidade, expressos como média $\pm$ SEM e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.1.3. Expressão de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama em resposta ao paclitaxel

Seguindo a investigação sobre a relação do perfil de miRNAs de células tumorais com a resposta a quimioterápicos, avaliou-se possíveis alterações na expressão de miR-7, miR-21 e miR-146a em resposta ao tratamento com paclitaxel.

Na linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 100 nM de paclitaxel promoveu um aumento significativo na expressão dos três miRNAs avaliados, em relação ao grupo não tratado (NT) (Figura 8A). O aumento observado na expressão relativa de miR-7 foi de 3,97 vezes, para miR-21 o aumento foi de 2,76 vezes e para miR-146a, de 2,82 vezes.

Na linhagem MDA-MB-436, não foi observada diferença significativa na expressão de miR-7 em decorrência do tratamento. Porém, na avaliação de miR-21 e miR-146a, foram identificados aumentos significativos na expressão relativa em resposta ao tratamento. Os aumentos na expressão de miR-21 e de miR-146a foram de 4,63 e 4,47 vezes, respectivamente, em relação ao grupo sem tratamento (Figura 8B).



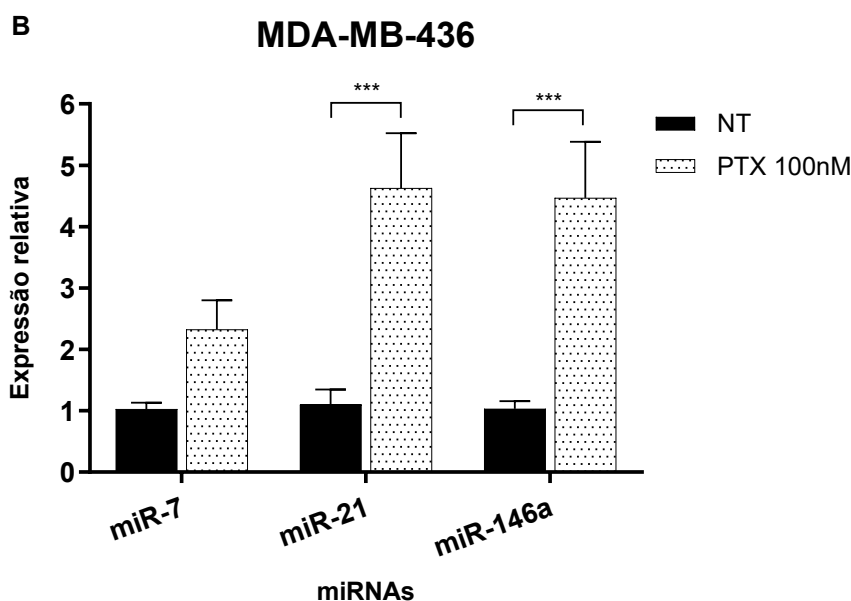


Figura 8. Expressão de miRNAs em linhagens celulares de câncer de mama após tratamento com paclitaxel. Na linhagem MDA-MB-231, houve aumento significativo na expressão de miR-7, miR-21 e miR-146a de 3,97, 2,76 e 2,82 vezes, respectivamente (A). Na linhagem MDA-MB-436, o aumento significativo na expressão relativa de miR-21 foi de 4,63 vezes e para miR-146a de 4,47 vezes. Não houve alteração significativa na expressão de miR-7, para esta linhagem (B). Ensaio de RT-qPCR, normalizados por miR-19b e RNU24. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e analisada pelo teste de Mann-Whitney. n=4. ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

4.1.4. Expressão basal de *PARP1* em linhagens celulares de câncer de mama

Para aprofundar nossa compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao tratamento com paclitaxel e identificar potenciais biomarcadores ou alvos terapêuticos, focamos nossa atenção em genes específicos potencialmente regulados pelos microRNAs em estudo. Com base em resultados experimentais prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa e em análises *in silico*, optou-se por iniciar a investigação pelo gene *PARP1* (Poli ADP-Ribose Polimerase 1), por apresentar possível regulação por miR-7 e importante papel na biologia tumoral.

Os resultados mostraram que as linhagens celulares triplo-negativas, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, apresentam expressão gênica basal de *PARP1* significativamente maior em relação à linhagem positiva para receptores hormonais, MCF-7. A linhagem MDA-MB-231 apresentou expressão de *PARP1* 1,75 vezes

superior, e a linhagem MDA-MB-436 expressão 1,62 vezes maior, em relação à linhagem MCF-7. Comparativamente, não foi observada diferença significativa na expressão de *PARP1* entre as linhagens triplo-negativas com diferentes status de *BRCA1*. (Figura 9).

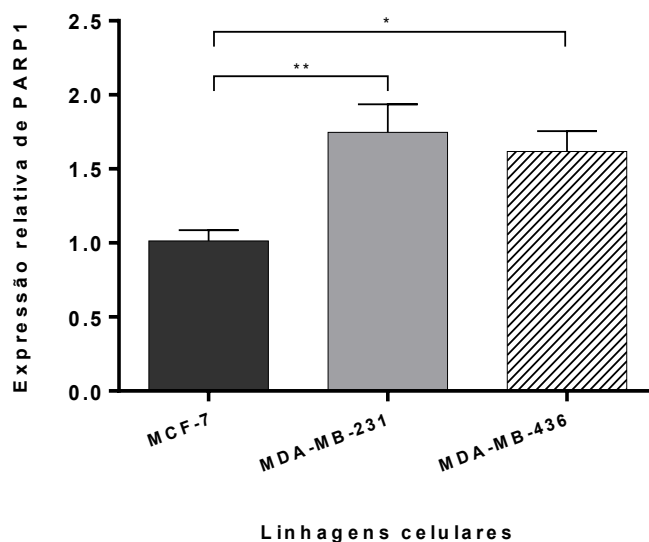


Figura 9. Expressão relativa basal de *PARP1* em linhagens celulares de câncer de mama. As linhagens celulares triplo-negativas (MDA-MB-231 e MDA-MB-436) apresentaram expressão significativamente maior de *PARP1* em relação à linhagem RH+ (MCF-7), sendo 1,75 vezes maior em MDA-MB-231 e 1,62 vezes maior em MDA-MB-436. As linhagens triplo-negativas não apresentaram diferença significativa na expressão de *PARP1*. Ensaios de RT-qPCR, normalizados pelos genes de referência GAPDH e GPB1. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e analisada pelo teste de Mann-Whitney. n=6. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.1.5. Expressão de *PARP1* em resposta à suplementação de miR-7 associada ao paclitaxel

Foram realizados ensaios para avaliar se a expressão gênica de *PARP1* seria regulada por miR-7, mediante transfecção celular com imitador sintético de miR-7 (miR-7 *mimic*) ou um *mimic* com sequência aleatória (*scramble*) na concentração de 1 nM ou 10 nM. Os efeitos da transfecção foram avaliados, também, com os imitadores sintéticos em associação ao tratamento com paclitaxel na concentração de 100 nM. As expressões relativas foram determinadas tendo como referência o grupo controle veículo (CV). A extração de RNA foi realizada 48 horas após a transfecção, para MDA-

MB-231 e MDA-MB-436, ou 72 horas após a transfecção, para MCF-7.

Na linhagem MCF-7, a transfecção isoladamente com 10 nM de miR-7 *mimic* ou *scramble mimic*, por 72 horas, não foi capaz de alterar a expressão relativa de *PARP1*. No grupo tratado somente com paclitaxel, foi constatada uma diminuição de na expressão de *PARP1* (0,42), assim como no grupo Scramble *mimic* + paclitaxel (0,38), porém, sem significância estatística em relação ao grupo controle e aos demais grupos. Entretanto, quando a suplementação com miR-7 *mimic* foi associada ao tratamento com paclitaxel, observou-se uma diminuição significativa para 0,27 vezes na expressão de *PARP1* em relação ao grupo controle. Essa redução também foi significativa quando comparada ao grupo apenas transfectado com miR-7 *mimic*, sem tratamento com o quimioterápico (Figura 10).

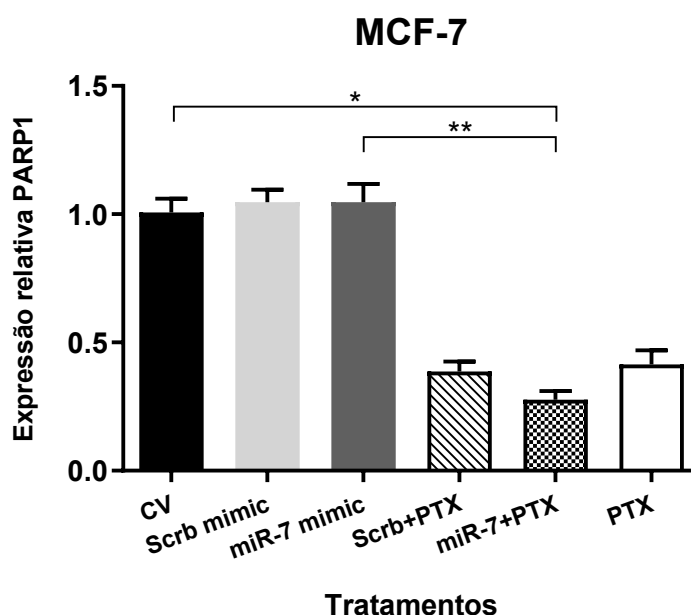


Figura 10. Expressão gênica de *PARP1* em células MCF-7 transfectadas com miR-7 *mimic* e tratadas com paclitaxel. A transfecção com miR-7 *mimic* ou Scramble (Scrb) *mimic* (10 nM) por 72 horas não alterou a expressão de *PARP1* em relação ao grupo controle (CV). O tratamento com paclitaxel (PTX) reduziu a expressão de *PARP1* para 0,42 vezes, enquanto a combinação Scrb *mimic* + PTX resultou em uma redução para 0,38 vezes, ambas sem diferença estatisticamente significativa. A associação entre miR-7 *mimic* e PTX promoveu uma redução significativa na expressão de *PARP1* para 0,27 vezes o nível basal. Ensaios de RT-qPCR, normalizados pelos genes de referência GAPDH e GPB1. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Kruskal-Wallis. n=6. * p<0.05, ** p<0.01.

Na linhagem MDA-MB-231, a transfecção com miR-7 *mimic* ou *scramble mimic* foi realizada na concentração de 1 nM, por 48 horas. A transfecção isolada com *scramble mimic*, sua associação com paclitaxel (PTX), assim como o tratamento exclusivo com o quimioterápico, não resultaram em redução significativa da expressão de *PARP1*, com valores relativos de 0,92, 0,75 e 0,86, respectivamente. De forma semelhante, a transfecção isolada com miR-7 *mimic* promoveu apenas uma redução discreta da expressão (0,76), sem significância estatística. No entanto, a associação de miR-7 *mimic* com PTX resultou em uma diminuição significativa da expressão de *PARP1*, atingindo 0,42 vezes em relação ao grupo controle (CV) (Figura 11).

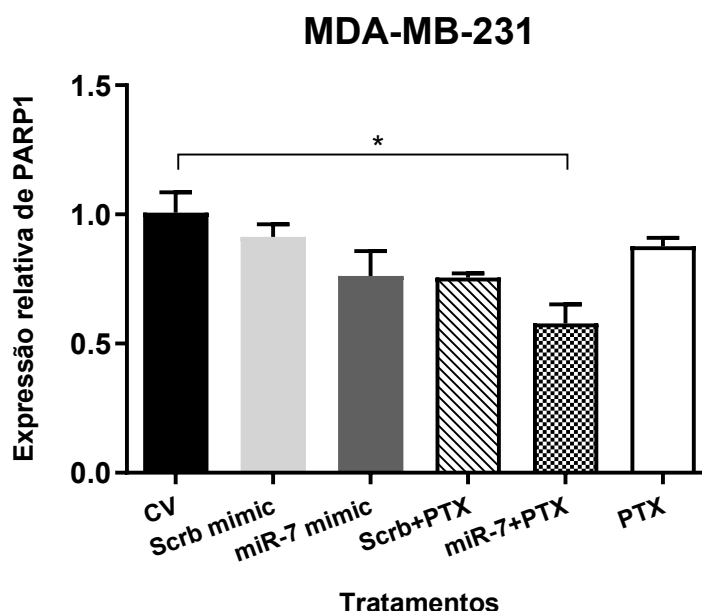


Figura 11. Expressão gênica de *PARP1* na linhagem MDA-MB-231, transfectada com miR-7 *mimic* e tratada com paclitaxel. Não foi observada alteração significativa na expressão de *PARP1* nos grupos tratados com *scramble mimic* isolado, *scramble* + PTX, PTX isolado ou miR-7 *mimic* isolado, em relação ao grupo controle (CV). Entretanto, a associação entre miR-7 *mimic* e PTX diminuiu a expressão de *PARP1* de forma significativa em relação ao grupo controle para 0,42 vezes). Ensaio de RT-qPCR, normalizados pelos genes de referência GAPDH e GPB1. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Kruskal-Wallis. n=4. * p<0.05.

Na linhagem MDA-MB-436, a transfecção com miR-7 *mimic* ou *scramble mimic* foi realizada na concentração de 1 nM, por 48 horas. Não foram observadas reduções significativas na expressão relativa de *PARP1* nos grupos transfectados isoladamente com *scramble mimic* (0,93) ou miR-7 *mimic* (0,87). O tratamento exclusivo com o

quimioterápico paclitaxel (PTX) resultou em uma diminuição significativa da expressão de *PARP1*, com valor relativo de 0,69. Reduções significativas também foram observadas nos grupos onde a transfecção com os imitadores sintéticos foi associada ao tratamento com PTX, com expressão relativa de 0,60 no grupo *scramble mimic* + paclitaxel e 0,61 no grupo *miR-7 mimic* + paclitaxel (Figura 12).

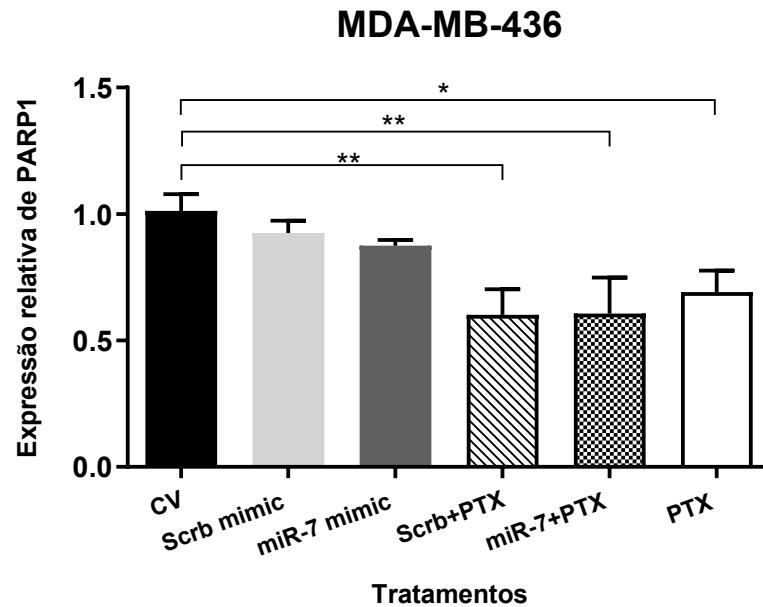


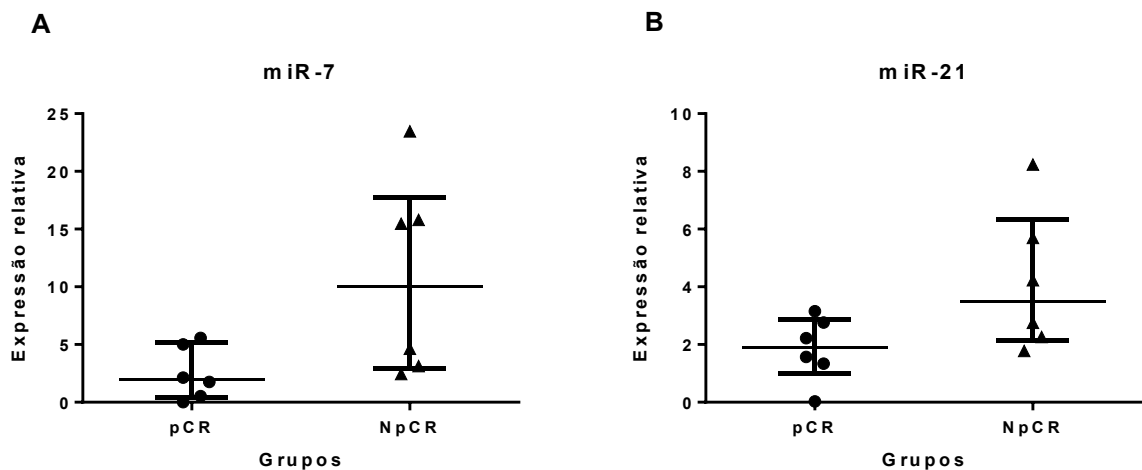
Figura 12. Expressão gênica de *PARP1* na linhagem MDA-MB-436, transfectada com *miR-7 mimic* e tratada com paclitaxel. Não foi observada alteração significativa na expressão de *PARP1* nos grupos com *scramble mimic* isolado (0,93) ou *miR-7 mimic* isolado (0,87), em relação ao grupo controle (CV). Nos grupos *Scrb+PTX* e *miR-7+PTX* foi observada diminuição na expressão de *PARP1* de forma significativa (0,60 e 0,61, respectivamente), bem como no grupo com uso isolado de PTX (0,69). Ensaio de RT-qPCR, normalizados pelos genes de referência GAPDH e GPB1. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Kruskal-Wallis. n=4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2. MIRNAS COMO BIOMARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA PATOLÓGICA COMPLETA (pCR) NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

4.2.1. Expressão de miRNAs em biópsias de pacientes com câncer de mama triplo-negativo

Com o objetivo de selecionar microRNAs candidatos a uma assinatura preditiva de Resposta Patológica Completa (pCR) à quimioterapia neoadjuvante, foram analisados os perfis de expressão de miR-7, miR-21 e miR-146a em amostras Fixadas em Formol e Embebidas em Parafina (FFPE) de biópsias de pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo (TNBC).

Comparativamente ao grupo de pacientes que atingiram a Resposta Patológica Completa (pCR), as pacientes do grupo sem resposta patológica (NpCR) apresentaram expressão aumentada dos três miRNAs avaliados. Em relação ao miR-7, houve um aumento de expressão de 10,82 vezes (Figura 13A), miR-21 mostrou-se 4,16 vezes mais expresso (Figura 12B) e, para o miR-146a, o aumento foi de 1,77 vezes (Figura 13C).



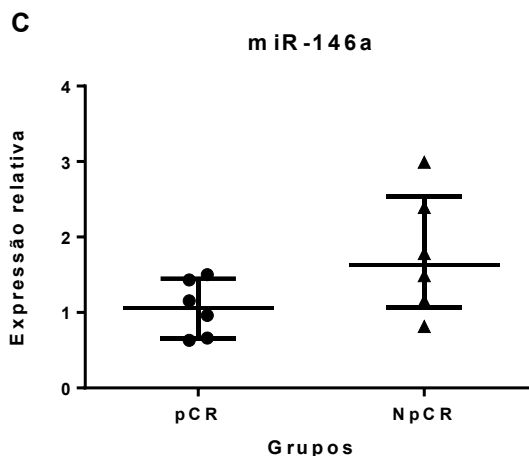


Figura 13. Expressão relativa de miRNAs em amostras FFPE de biópsia de pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo. No grupo das pacientes que não atingiram a Resposta Patológica Completa (NpCR), foi observado um aumento de 10,82 vezes na expressão de miR-7 (A), 4,16 vezes na expressão de miR-21 (B) e 1,77 vezes na expressão de miR-146a (C), em relação às pacientes que atingiram a Resposta Patológica Completa (pCR) após a quimioterapia neoadjuvante, porém, sem significância estatística. Ensaio de RT-qPCR utilizando o sistema de detecção *TaqMan miRNA Assays*, normalizados pelos miRNAs calibradores miR-19b, miR-671 e RNU24. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e analisada pelo teste de Mann-Whitney. n=6.

Individualmente, não houve significância estatística na comparação entre os grupos de pacientes com e sem resposta patológica completa, para os três miRNAs testados. Porém, com base na tendência observada e na ponderação das limitações metodológicas do ensaio, optou-se por seguir com a investigação de um potencial uso combinado entre os três miRNAs.

4.2.2. Análise da assinatura de miRNAs como biomarcador preditivo de resposta patológica completa (pCR) em pacientes com TNBC

A análise de desempenho da assinatura de miRNAs como biomarcador preditivo de Resposta Patológica Completa, proposta neste estudo, foi realizada mediante metodologia da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), considerando o perfil de expressão individual de cada miRNA (miR-7, miR-21 e miR-146a), bem como a análise conjunta dos perfis, calculado individualmente para cada paciente, visando identificar a melhor combinação entre eles.

A análise da curva ROC avaliada individualmente para miR-7 resultou em um valor da área sob a curva (AUC – Area Under the Curve) de 0,83, com Intervalo de Confiança (IC 95%) de 0,59 a 1,08. Foram utilizados os valores de sensibilidade de 83,33% e especificidade de 66,67%, com $p = 0,06$ (Figura 14A). Para miR-21, os valores resultantes da análise individual foram AUC = 0,80 (IC 95% - 0,56 a 1,06), com índices de sensibilidade de 83,33% e especificidade de 66,67%, com $p = 0,08$ (Figura 14B). Já os valores obtidos para miR-146a foram AUC = 0,79 (IC 95% - 0,53 a 1,06) e índices de sensibilidade de 83,33%, especificidade de 66,67% e $p = 0,093$ (Figura 14C).

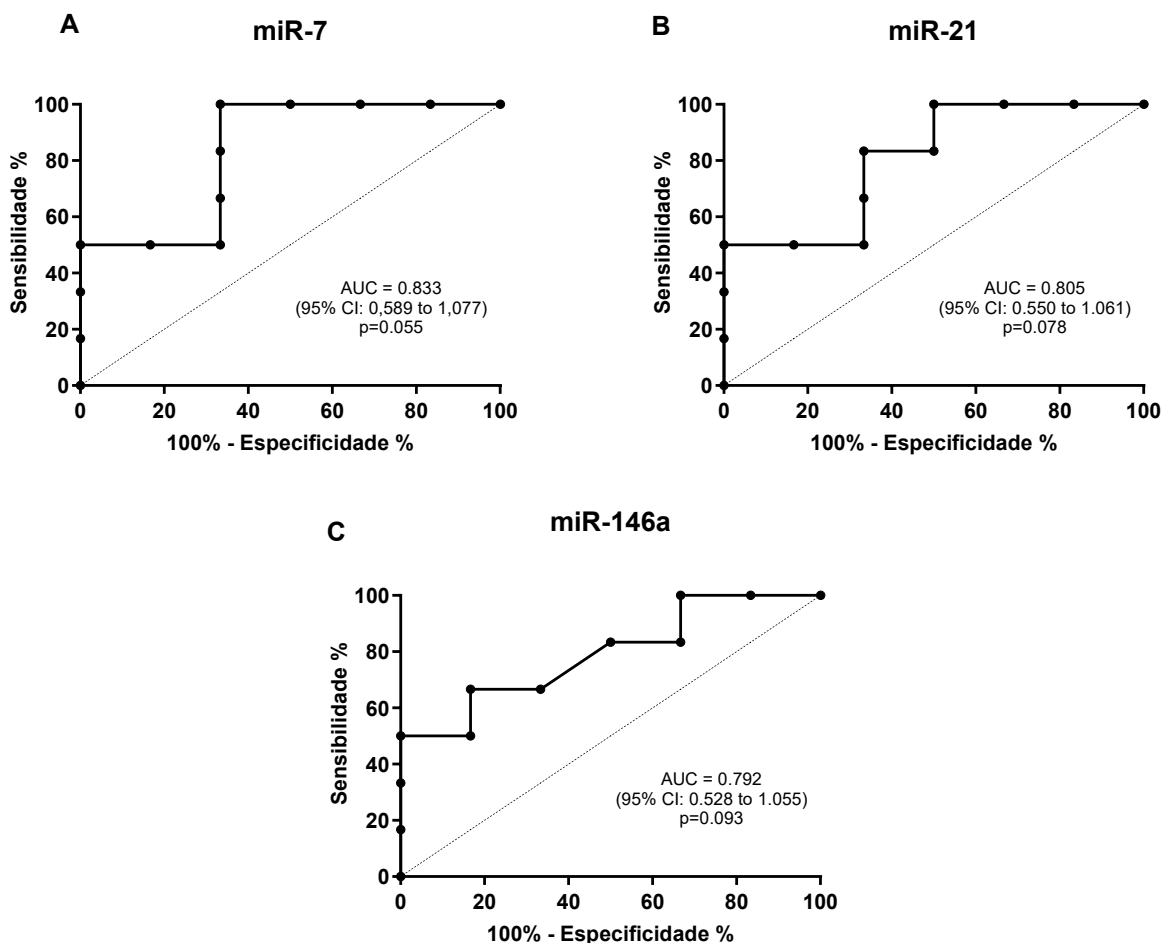


Figura 14. Curva ROC do perfil de expressão de miRNAs em pacientes com TNBC. A análise individual do perfil de expressão de miRNAs resultou nos valores para miR-7 de AUC = 0,833 (IC 95% de 0,589 a 1,077), sensibilidade de 83,33% e especificidade de 66,67% ($p = 0,055$) (A). Para miR-21, os valores foram AUC = 0,805 (IC 95% de 0,550 a 1,061), com sensibilidade de 83,33% e especificidade de 66,67% ($p = 0,078$) (B). Os valores obtidos para miR-146a foram AUC = 0,792 (IC 95% de 0,528 a 1,055), sensibilidade de 83,33% e especificidade de 66,67% ($p = 0,0928$) (C). N = 6.

A análise da curva ROC com o perfil combinado dos três miRNAs avaliados no estudo – miR-7, miR-21 e miR-146a – resultou em um valor da área sob a curva (AUC) de 0,94, com Intervalo de Confiança (IC 95%) de 0,82 a 1,08 (Figura 15A). O ponto de corte (*cut-off*) foi estabelecido com base no índice de Youden (J) e visando otimizar a relação entre os índices de sensibilidade e especificidade, de acordo com os objetivos da assinatura e as características dos grupos experimentais. Foram utilizados os índices de sensibilidade de 83,33% e especificidade de 83,33%, resultando em um valor de *cutt-off* de 3,094 (Figura 15B).

Por meio da interpretação da curva ROC, foi constatado que os melhores resultados foram obtidos com a análise combinada do perfil de expressão de miR-7, miR-21 e miR-146a, com capacidade de discriminar corretamente as pacientes que responderam ou não ao tratamento. Observou-se que a maioria das pacientes no grupo NpCR foi posicionada acima do ponto de corte, enquanto a maioria das pacientes no grupo pCR foi posicionada abaixo do ponto de corte, com uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,010$).

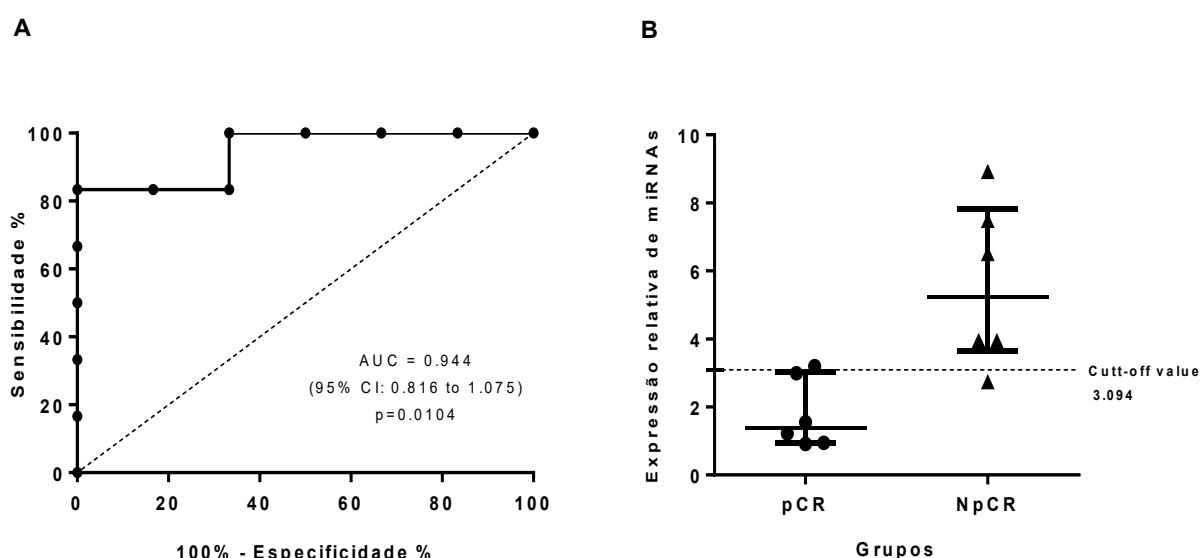


Figura 15. Assinatura de miRNAs como biomarcadores preditivos de Resposta Patológica Completa (pCR) em pacientes com TNBC. Curva ROC representando a análise conjunta do perfil de expressão de miR-7, miR-21 e miR-146a. Área sob a curva (AUC) de 0,944 (IC 95% 0,816 a 1,075), sensibilidade de 83,33% e especificidade de 83,33%, $p = 0,0104$ (A). Gráfico de dispersão indicando a separação entre o grupo com resposta patológica completa (pCR) e sem resposta (NpCR) com base no valor de corte (*cutt-off*) de 3,094, gerado pela análise da curva ROC. N = 6, cada grupo (B).

4.3. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA – MIRNAS COMO BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS DE DESFECHOS CLÍNICOS NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

4.3.1. Seleção de pacientes

Foram analisados dados provenientes de *miRNA-seq* da coorte de câncer de mama do “Atlas do Genoma do Câncer” (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA), previamente normalizados em escala logarítmica ($\log_2[\text{RPM} + 1]$), possibilitando a comparação da expressão de miRNAs entre as amostras. Inicialmente, foram selecionados 1.247 pacientes, das quais 1.101 apresentavam informações resultantes de biópsias de tumores primários, sendo excluídas as informações relativas a metástases (Figura 16). Na etapa seguinte, foram selecionadas pacientes com diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo, com base na classificação PAM50 (*basal-like*) e com status negativos dos receptores de estrogênio (ER-), progesterona (PR-) e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2-), totalizando 111 pacientes. Dentre essas, 93 apresentavam dados de expressão para miR-7, miR-21 e/ou miR-146a, sendo, então, divididas em dois grupos: I) Com evento – pacientes que apresentaram pelo menos um dos seguintes desfechos, Intervalo Livre de Doença (*Disease-Free Interval* – DFI), Sobrevida Específica da Doença (*Disease-Specific Survival* – DSS), Intervalo Livre de Progressão (*Progression-Free Interval* – PFI) e Sobrevida Global (*Overall Survival* – OS); II) Sem evento – pacientes que não apresentaram nenhum dos eventos mencionados. Por fim, foram excluídas as pacientes com idade igual ou superior a 80 anos, bem como, no grupo sem eventos, aquelas com tempo de acompanhamento (*follow-up*) inferior a 5 ou superior a 10 anos. Dentre as opções iniciais de desfechos clínicos disponíveis no banco de dados, foram selecionados o Intervalo Livre de Doença (DFI) e a Sobrevida Específica da Doença (DSS) para as análises finais, por apresentarem dados mais completos em todas as amostras e potencial elucidativo compatível com o objetivo do estudo. A amostra final submetida à análise estatística foi composta por 36 pacientes, sendo 18 com ocorrência de evento de progressão ou óbito, e 18 sem nenhum evento registrado.

As informações complementares referentes à idade ao diagnóstico e ao estadiamento clínico das pacientes estão apresentadas na Tabela 5.

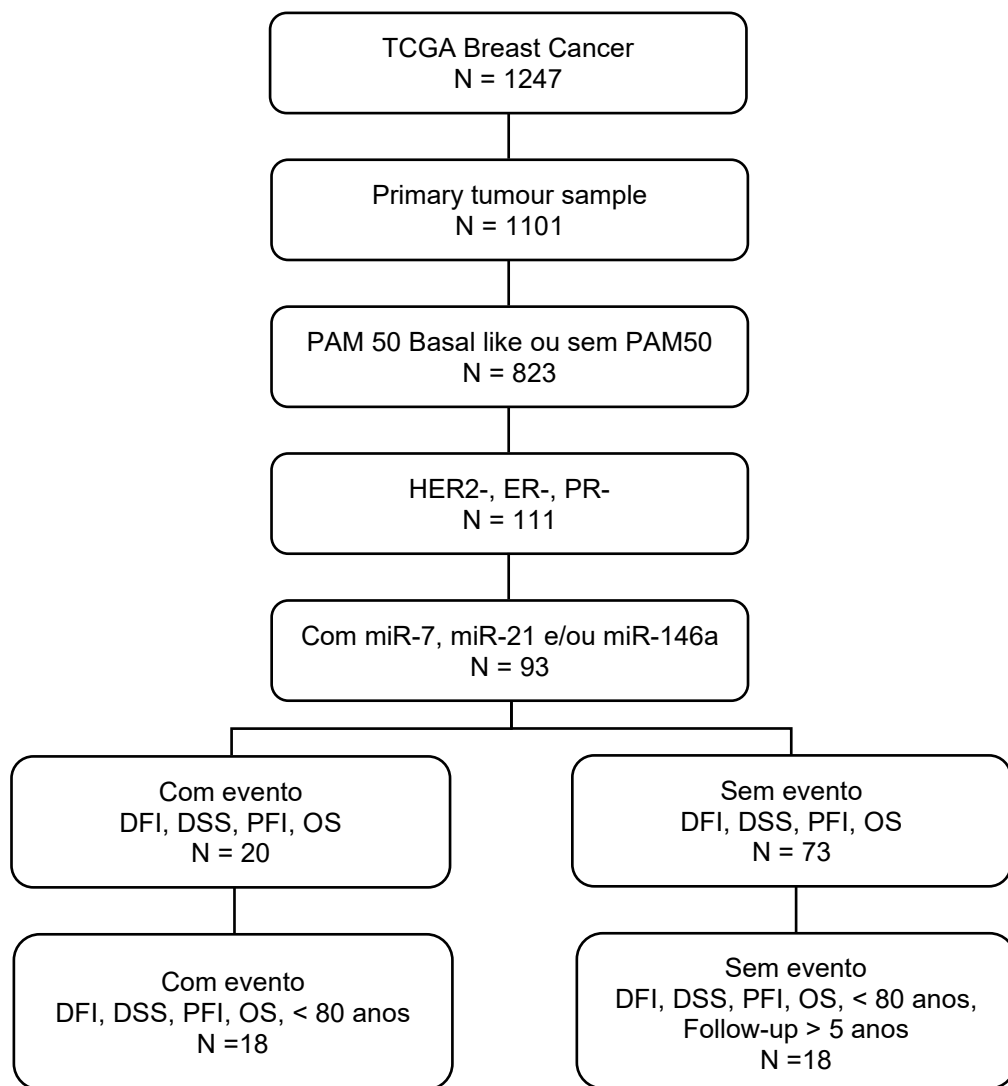


Figura 16. Fluxograma de pacientes selecionadas para análise do banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

Tabela 5 – Perfil de idade e estadiamento clínico das pacientes selecionadas

Características	Sem evento	Com evento
Idade no diagnóstico	52,3 ± 12,6	53,8 ± 12,2
Estadiamento Clínico		
I	4 (22%)	-
IA	1 (6%)	1 (6%)
II	2 (11%)	-
IIA	9 (50%)	7 (39%)
IIB	2 (11%)	2 (11%)
IIIA	-	4 (22%)
IIIC	-	3 (17%)
IV	-	1 (6%)

4.3.2. Análises de acurácia de assinaturas de microRNAs, por meio de curvas ROC

Com o objetivo de ampliar a investigação do potencial prognóstico dos miRNAs em pacientes com TNBC, foram conduzidas avaliações de acurácia mediante análises de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), considerando os desfechos clínicos de Intervalo Livre de Progressão (PFI) e Sobrevida Específica da Doença (DSS), em amostras provenientes do banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

As pacientes foram inicialmente estratificadas em dois grupos, com alta ou baixa expressão de miRNAs, com base na mediana dos níveis de expressão de cada miRNA avaliado. Foram conduzidas análises individuais para cada miRNA, bem como análises integradas, com o objetivo de identificar combinações com a maior capacidade preditiva, em relação aos desfechos clínicos avaliados. Os eventos considerados para as análises foram a progressão da doença e/ou óbito em decorrência da doença. O tempo até a ocorrência do evento foi calculado em meses, sendo considerados censurados os casos sem evento no momento do último seguimento, que variou entre 60 e 120 meses, ou seja, 5 a 10 anos de acompanhamento.

As curvas ROC foram utilizadas para investigar a capacidade discriminativa da expressão dos miRNAs selecionados em relação à ocorrência dos desfechos clínicos ao longo do tempo de seguimento. Para cada miRNA, foram calculados os valores da área sob a curva (AUC), sensibilidade, especificidade e o ponto de corte ideal (*cutt-off*), estimado com base no índice de Youden (J). Os resultados obtidos indicaram que miR-146a apresentou o desempenho mais robusto na estratificação prognóstica de pacientes com câncer de mama triplo-negativo, tanto para o Intervalo Livre de Progressão (PFI) quanto para a Sobrevida Específica da Doença (DSS), avaliado individualmente ou em combinação com o miR-21.

Na análise individual para o desfecho de PFI, miR-146a apresentou área sob a curva (AUC) de 0,72 (IC95% de 0,54 a 0,90), com $p = 0,03$, sensibilidade de 86,67% e especificidade de 61,11% (Figura 17A). O ponto de corte foi 8,86, com predomínio de pacientes sem evento exibindo níveis de expressão acima desse limiar, enquanto a maioria das pacientes com evento apresentou valores inferiores (Figura 17B).

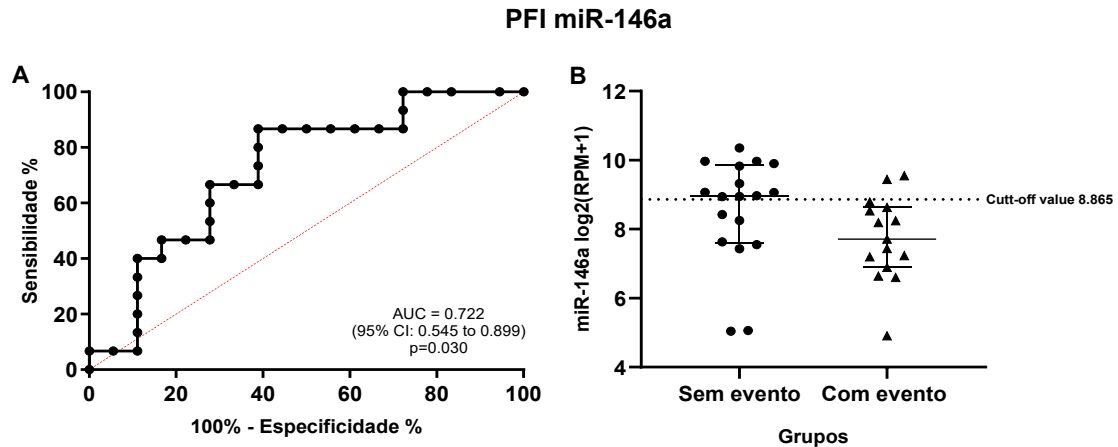


Figura 17. Curva ROC do perfil de expressão de miR-146a para o desfecho de Intervalo Livre de Progressão (PFI) em pacientes com TNBC. Área sob a curva (AUC) de 0,722 (IC 95% 0,544 a 0,899), $p = 0,030$; sensibilidade de 86,67% e especificidade de 61,11% (A). Gráfico de dispersão indicando a separação entre os grupos sem ($n = 18$) e com progressão ($n = 15$), com ponto de corte de 8,865 (B).

Para o desfecho de DSS, o desempenho do miR-146a também se destacou, com AUC de 0,77 (IC95% de 0,58 a 0,95), $p = 0,02$, sensibilidade de 90,00% e especificidade de 72,22% (Figura 18A). O ponto de corte estimado foi 8,24, sendo novamente observada uma concentração maior de pacientes sem evento com níveis de expressão superiores ao limiar, enquanto a maior parte das pacientes com evento apresentou valores abaixo desse ponto (Figura 18B).

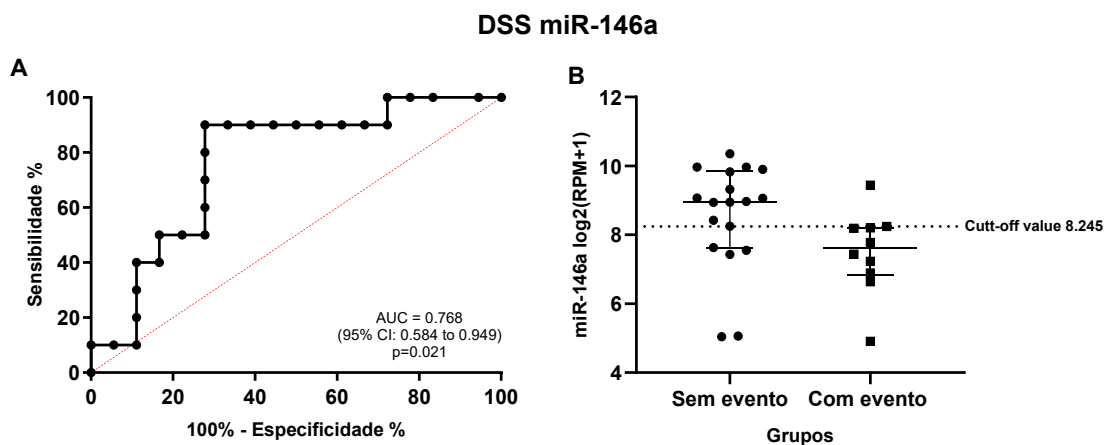


Figura 18. Curva ROC do perfil de expressão de miR-146a para o desfecho de Sobrevida Específica da Doença (DSS) em pacientes com TNBC. Área sob a curva (AUC) de 0,768 (IC 95% 0,584 a 0,949), $p = 0,021$; sensibilidade de 90,00% e especificidade de 72,22% (A). Gráfico de dispersão indicando a separação entre os grupos sem ($n = 18$) e com óbito relacionado à doença ($n = 11$), com ponto de corte de 8,245 (B).

Para o desfecho de PFI, a análise combinada de miR-146a e miR-21 também apresentou desempenho significativo, com área sob a curva (AUC) de 0,72 (IC95% de 0,55 a 0,89), $p = 0,033$, sensibilidade de 78,57% e especificidade de 61,11% (Figura 19A). O ponto de corte identificado foi 13,11, com níveis de expressão mais elevados entre as pacientes sem progressão, enquanto aquelas que evoluíram com o evento exibiram predominantemente valores abaixo do limiar (Figura 19B).

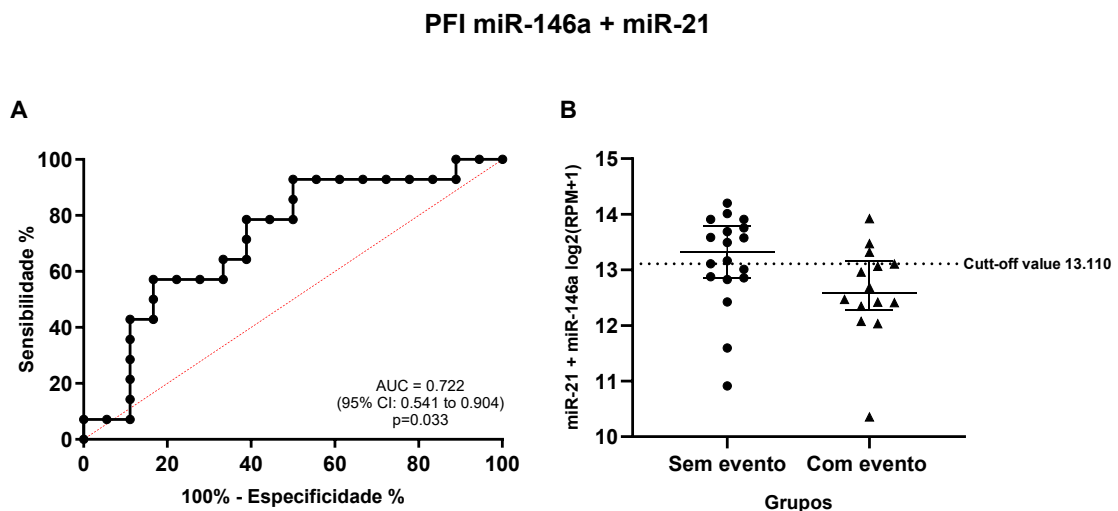


Figura 19. Curva ROC da combinação dos perfis de expressão de miR-146a e miR-21 para o desfecho de Intervalo Livre de Progressão (PFI) em pacientes com TNBC. Área sob a curva (AUC) de 0,722 (IC 95% de 0,541 a 0,904), $p = 0,033$; sensibilidade de 78,57% e especificidade de 61,11% (A). Gráfico de dispersão indicando a separação entre os grupos sem ($n = 18$) e com progressão ($n = 14$), com ponto de corte de 13,110 (B).

De forma semelhante, para o desfecho de DSS, a combinação dos mesmos miRNAs resultou em AUC de 0,77 (IC 95%: 0,57 a 0,96), com $p = 0,021$. Os valores de sensibilidade e especificidade foram de 90,00% e 66,67%, respectivamente (Figura 20A). O ponto de corte estimado foi 13,00, sendo observada uma distribuição majoritária de pacientes sem óbito específico com níveis de expressão acima desse valor, enquanto a maior parte dos casos com evento apresentou expressão inferior ao limiar estabelecido (Figura 20B).

DSS miR-146a + miR-21

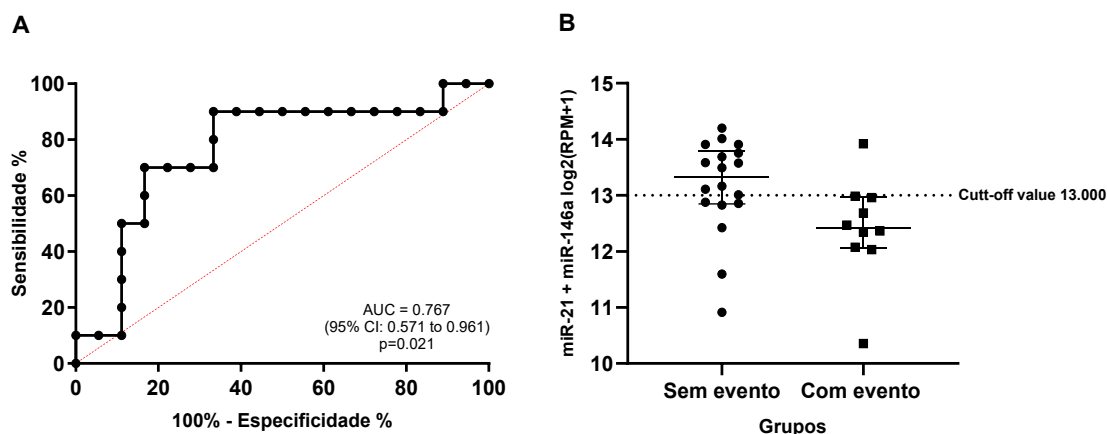


Figura 20. Curva ROC da combinação dos perfis de expressão de miR-146a e miR-21 para o desfecho de Sobrevida Específica da Doença (DSS) em pacientes com TNBC. Área sob a curva (AUC) de 0,767 (IC 95% de 0,571 a 0,961), $p = 0,021$; sensibilidade de 90,00% e especificidade de 66,67% (A). Gráfico de dispersão indicando a separação entre os grupos sem ($n = 18$) e com óbito relacionado à doença ($n = 10$), com ponto de corte de 13,000 (B).

Embora tenham sido observadas variações nos perfis de expressão dos microRNAs isoladamente e em outras combinações entre eles, as demais análises não evidenciaram desempenho preditivo significativo. Os dados obtidos em todas as análises realizadas estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Dados sobre curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para investigação do potencial prognóstico de microRNAs em amostras de câncer de mama triplo-negativo provenientes do TCGA.

Evento	miRNA	AUC	Sensibilidade	Especificidade	Valor de p
FPI	miR-7	0,567	64,29	56,25	0,533
	miR-21	0,681	78,57	55,65	0,099
	miR-146a	0,722	86,67	61,11	< 0,05 *
	miR-7 + miR-21	0,536	85,71	31,25	0,739
	miR-7 + miR-146a	0,638	78,57	62,50	0,197
	miR-146a + miR-21	0,722	78,57	61,11	< 0,05 *
DSS	Assinatura	0,663	71,43	66,67	0,119
	miR-7	0,552	66,67	56,25	0,712
	miR-21	0,686	80,00	50,00	0,108

miR-146a	0,768	90,00	72,22	< 0,05 *
miR-7 + miR-21	0,578	87,50	31,25	0,540
miR-7 + miR-146a	0,687	75,00	68,75	0,141
miR-146a + miR-21	0,767	90,00	66,67	< 0,05 *
Assinatura	0,729	87,50	55,56	0,067

Legenda: FPI = Intervalo Livre de Progressão; DSS = Sobrevida Específica da Doença; Assinatura = média dos 3 microRNAs avaliados; AUC = área sob a curva. Sensibilidade e a Especificidade expressas em porcentagem (%), calculadas pelo Índice de Youden (J). (*) Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

4.3.3. Análise das curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier

Para avaliar a associação entre os níveis de expressão de microRNAs e os desfechos clínicos de Intervalo Livre de Progressão (PFI) e Sobrevida Específica da Doença (DSS), foram conduzidas análises de sobrevida utilizando o método de Kaplan-Meier, com a comparação entre os grupos por meio do teste log-rank (Mantel-Cox). Os critérios utilizados para estratificação das pacientes e censura dos dados foram os mesmos descritos anteriormente.

Para o primeiro desfecho avaliado, Intervalo Livre de Progressão (PFI), a análise da assinatura composta por miR-7, miR-21 e miR-146a demonstrou associação estatisticamente significativa ($p = 0,026$). Os indivíduos pertencentes ao grupo com alta expressão combinada dos miRNAs apresentaram maior tempo livre de progressão durante o período de seguimento, em comparação àqueles do grupo com baixa expressão, com medianas de 79,03 e 32,37 meses, respectivamente. A razão de risco (*hazard ratio* – HR) estimada foi de 3,41 para o grupo de baixa expressão em relação ao grupo de alta expressão, com intervalo de confiança (IC95%) de 1,18 a 9,86, indicando que pacientes com baixa expressão combinada dos três miRNAs avaliados apresentaram risco aproximadamente 3,4 vezes maior de progressão da doença, em relação ao grupo de alta expressão (Figura 21).

As análises individuais de cada miRNA, assim como as demais combinações avaliadas, não demonstraram potencial preditivo significativo para este desfecho.

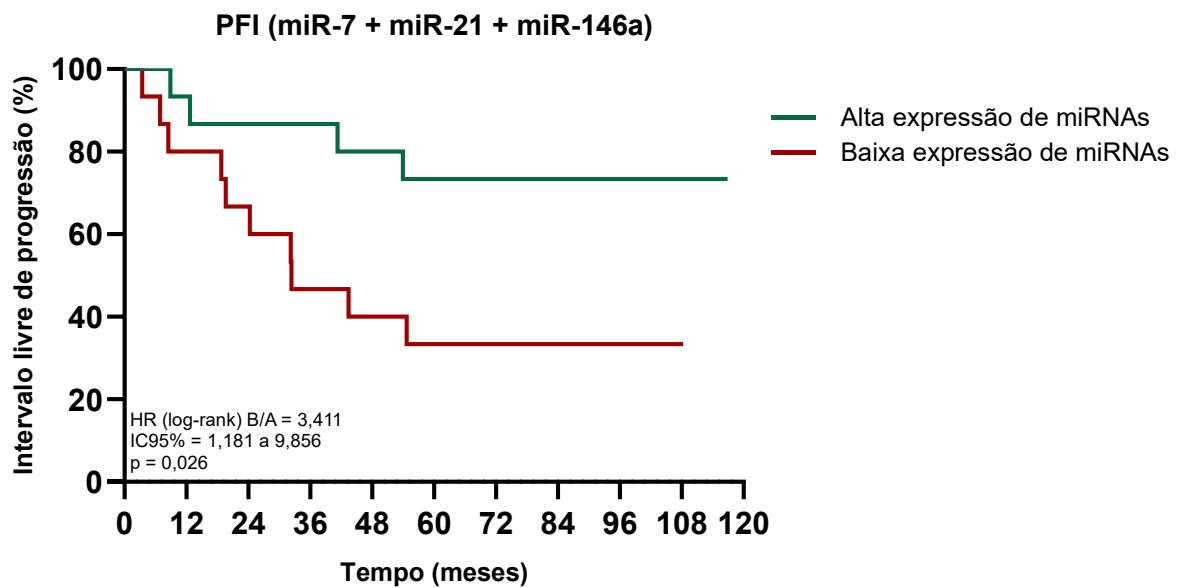


Figura 21. Curva de Kaplan-Meier representando o Intervalo Livre de Progressão (PFI) de pacientes com câncer de mama triplo-negativo, estratificadas pela expressão combinada de miR-7, miR-21 e miR-146a. Grupo com alta expressão (linha verde; n = 15) e grupo com baixa expressão (linha vermelha; n = 15). Indivíduos com baixa expressão apresentaram um tempo significativamente menor de progressão, em comparação aos indivíduos do grupo com alta expressão (mediana de 32,37 vs. 79,03 meses, respectivamente). p = 0,026.

A análise de Sobrevida Específica da Doença (DSS) indicou que tanto a avaliação isolada da expressão do miR-146a quanto sua combinação com o miR-21 apresentou capacidade preditiva estatisticamente significativa. Para miR-146a individualmente, a mediana de DSS foi de 83,87 meses no grupo com alta expressão e de 55,48 meses no grupo com baixa expressão, com razão de risco (HR) estimada em 13,09 (IC 95% de 3,71 a 46,23) e valor de p = 0,001. Este resultado indica que indivíduos com baixa expressão de miR-146a apresentaram um risco aproximado de morte por câncer de mama 13 vezes maior do que indivíduos com alta expressão, durante o segmento avaliado (Figura 22).

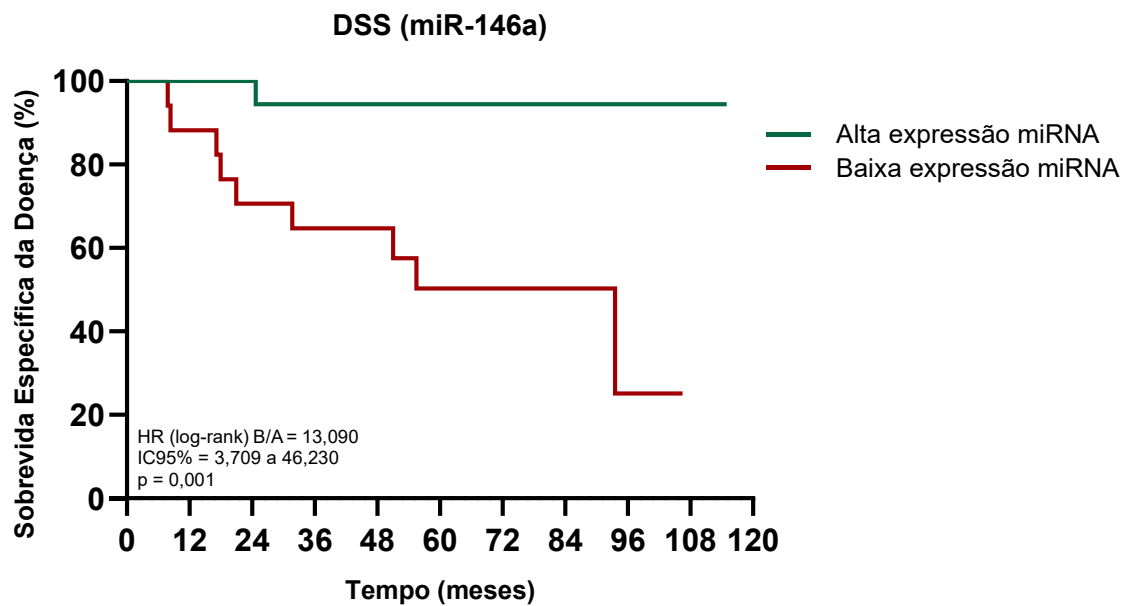


Figura 22. Curva de Kaplan-Meier representando a Sobrevida Específica da Doença (DSS) de pacientes com câncer de mama triplo-negativo, estratificadas pela expressão de miR-146a. Grupo com alta expressão (linha verde; n = 17) e grupo com baixa expressão (linha vermelha; n = 17). Indivíduos com baixa expressão de miR-146a apresentaram redução significativa de sobrevida, em comparação ao indivíduos do grupo com alta expressão (mediana de 55,48 vs. 83,87 meses, respectivamente). $p = 0,001$.

De modo semelhante, a análise combinada da expressão de miR-146a e miR-21 revelou medianas de DSS de 83,87 meses no grupo com alta expressão e 55,48 meses no grupo com baixa expressão. A diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,011$), com razão de risco (HR) estimada em 10,80 (IC95%: 2,88 a 40,49), indicando que pacientes com a baixa expressão combinada desses dois miRNAs apresentaram risco aproximadamente 10,8 vezes maior de óbito relacionado à doença durante o período de seguimento (Figura 23).

As demais análises realizadas, tanto para os microRNAs individualmente quanto para as combinações testadas, não apresentaram desempenho preditivo estatisticamente significativo em relação a este desfecho.

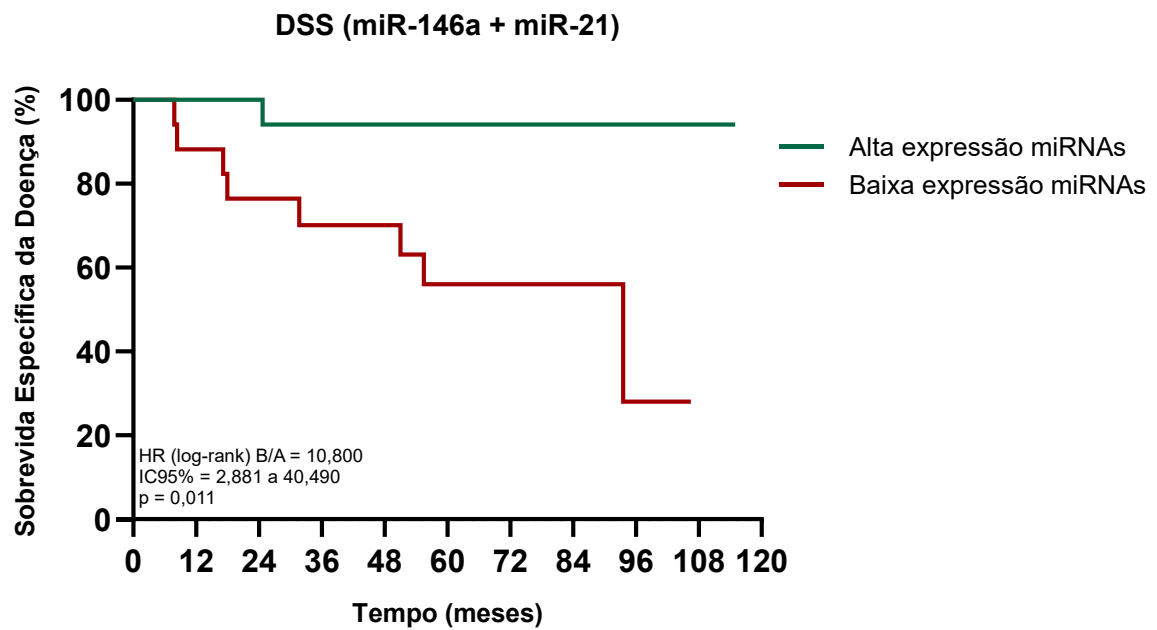


Figura 23. Curva de Kaplan-Meier representando a Sobrevida Específica da Doença (DSS) de pacientes com câncer de mama triplo-negativo, estratificadas pela expressão de miR-146a e miR-21. Grupo com alta expressão (linha verde; n = 17) e grupo com baixa expressão (linha vermelha; n = 17). Indivíduos com baixa expressão combinada de miR-146a e miR-21 apresentaram redução significativa de sobrevida, em comparação ao indivíduos do grupo com alta expressão (mediana de 55,48 vs. 83,87 meses, respectivamente). p = 0,011.

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) distingue-se dos demais subtipos por seu comportamento biológico mais agressivo, o que torna seu tratamento substancialmente mais desafiador. Esse subtipo está associado a maior incidência de recorrência tumoral e metástases, contribuindo para um prognóstico global desfavorável, especialmente em pacientes diagnosticadas em estágios avançados da doença. Além disso, o manejo clínico do TNBC permanece significativamente defasado em comparação aos demais subtipos de câncer de mama, devido à escassez de terapias-alvo eficazes e da evolução clínica menos favorável (105,115,116).

Modelos celulares bidimensionais são amplamente utilizados e tem contribuído de forma relevante para o avanço da pesquisa translacional em oncologia, porém, sua aplicabilidade clínica permanece limitada. Em particular, a ausência de heterogeneidade celular e a incapacidade de reproduzir com precisão o microambiente tumoral, prejudicam a representação dos fatores que modulam a progressão da doença e a resposta terapêutica (117). Diante desse cenário, se faz importante a validação de hipóteses em diferentes formatos, incluindo modelos animais, amostras tumorais de pacientes e análises integrativas baseadas em dados provenientes de bancos públicos internacionais. Essa abordagem é essencial para ampliar a representatividade biológica dos estudos pré-clínicos, contribuindo para maior eficácia na translação para a prática clínica.

Na sessão de análises funcionais *in vitro*, o presente estudo visou avaliar as diferenças entre linhagens celulares de câncer de mama hormônio-positiva (MCF-7) e triplo-negativas (MDA-MB-231 e MDA-MB-436), com ênfase no perfil de expressão de miRNAs e na resposta ao quimioterápico paclitaxel. Foram selecionados os miRNAs miR-7, miR-21, miR-146a e miR-671, com base em dados experimentais previamente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, bem como em evidências da literatura científica que indicam o envolvimento desses miRNAs em processos relacionados à progressão tumoral e à resposta terapêutica no câncer de mama. Paralelamente, foi investigado o potencial regulatório de miR-7 sobre a expressão de *PARP1*, em modelos celulares de câncer de mama triplo-negativo com dois status funcionais do gene *BRCA1*, competente ou mutado.

A linhagem MDA-MB-231 demonstrou um perfil de maior resistência ao paclitaxel, uma vez que concentrações inferiores a 60 nM não promoveram redução significativa da viabilidade celular. Além disso, observou-se uma discreta recuperação da viabilidade na concentração mais elevada testada, 960 nM, sugerindo um possível mecanismo adaptativo ou seleção de subpopulações celulares resistentes, fenômeno frequentemente associado à exposição prolongada ou intensa a agentes quimioterápicos. Em contraste, a linhagem MDA-MB-436 demonstrou maior sensibilidade ao paclitaxel, com redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 30 nM, mantendo uma resposta dose-dependente ao longo de todo o intervalo de concentrações testadas, além de não apresentar sinais de resistência ao quimioterápico.

O efeito citotóxico do paclitaxel sobre células tumorais é influenciado por diversos fatores, incluindo a concentração do fármaco, o tipo celular e o tempo de exposição. Independentemente da indução de parada do ciclo celular, o paclitaxel é capaz de promover apoptose por múltiplos mecanismos, envolvendo a ativação de quinases, como MAPK, Raf-1 e JNK, além da modulação da expressão de proteínas reguladoras da apoptose, como Bcl-2, Bad e Bcl-xL, bem como de receptores associados à necrose tumoral, como DR4 e DR5 (95). No entanto, a resistência ao paclitaxel constitui um desafio mecanístico complexo, uma vez que envolve uma variedade de fatores, incluindo a superexpressão de bombas de efluxo de fármacos, inativação metabólica de drogas, mecanismos de reparo de DNA e alterações estruturais ou mutacionais nos alvos moleculares do fármaco (118,119).

A instabilidade genômica permite que as células tumorais adquiram características que lhes conferem vantagens proliferativas em relação às células normais, incluindo autossuficiência em sinais de crescimento, resistência a sinais inibitórios de proliferação, evasão da apoptose, angiogênese sustentada, invasão tecidual e potencial metastático (57,120). Essa instabilidade também afeta a expressão de miRNAs, comprometendo vias regulatórias críticas envolvidas na iniciação e progressão tumoral.

Dentre as diversas classes de moléculas regulatórias, os miRNAs têm ganhado destaque significativo por sua atuação eficaz na regulação pós-transcricional da expressão gênica, mediada por reconhecimento específico de sequência. Evidências acumuladas indicam que os miRNAs desempenham funções cruciais como marcadores moleculares, podendo atuar tanto como oncogenes quanto como

supressores tumorais em distintas neoplasias, incluindo o câncer de mama triplo-negativo (121).

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição de células de câncer de mama ao paclitaxel é capaz de modificar significativamente o perfil de expressão de miRNAs associados a processos de resposta e resistência a quimioterápicos. Esses efeitos, no entanto, não ocorrem de forma uniforme, sendo fortemente influenciados pelo contexto genético e molecular da célula tumoral. Tal variabilidade na modulação dos miRNAs em resposta ao tratamento pode refletir, em nível experimental, o espectro de respostas terapêuticas observado na prática clínica, no qual pacientes com tumores de diferentes perfis genéticos apresentam respostas heterogêneas ao mesmo agente quimioterápico (40,122,123).

A análise dos dados do presente estudo evidenciou efeitos distintos na expressão dos miRNAs entre as diferentes linhagens celulares de câncer de mama tratadas com paclitaxel. Nas linhagens triplo-negativas foram observadas alterações semelhantes na expressão dos miRNAs avaliados, e diferentes daquelas observadas na linhagem hormônio-positiva, reforçando a complexidade da resposta tumoral ao tratamento quimioterápico e a influência do contexto molecular. Na linhagem *BRCA1* competente (MDA-MB-231), houve um aumento expressivo na expressão dos três miRNAs analisados e na linhagem com mutação em *BRCA1* (MDA-MB-436), o tratamento promoveu elevação significativa na expressão de miR-21 e miR-146a, enquanto a expressão de miR-7 permaneceu inalterada. Já na linhagem hormônio-positiva, MCF-7, a exposição ao paclitaxel resultou em redução da expressão de miR-7, sem alteração significativa nos níveis de miR-21.

O perfil de expressão de miRNAs está intimamente relacionado às características moleculares intrínsecas de cada subtipo de câncer de mama, podendo refletir adaptações funcionais específicas ou desempenhar papel ativo na regulação de fenótipos tumorais distintos (124–128). Considerando o conhecimento crescente sobre a relevância dos miRNAs na patogênese e progressão do câncer de mama, a análise de seus níveis de expressão, particularmente no contexto da heterogeneidade molecular do TNBC, pode contribuir de forma significativa para o aprimoramento das abordagens diagnósticas, terapêuticas e prognósticas.

Assim, buscou-se ampliar o entendimento das diferenças intrínsecas dos subtipos tumorais, mediante análise do perfil basal de expressão dos miRNAs. Os resultados revelaram diferenças marcantes na expressão de miR-7, miR-21, miR-671

e miR-146a entre linhagens de câncer de mama com distintos perfis moleculares, com as linhagens triplo-negativas, independentemente do status funcional de *BRCA1*, apresentando redução consistente na expressão miR-7, miR-21, miR-671 e expressão substancialmente elevada de miR-146a. A comparação entre as duas linhagens triplo-negativas não revelou diferenças significativas nos níveis de expressão de miR-7, miR-21 e miR-671, sugerindo que a funcionalidade do gene *BRCA1* não é fator determinante para a regulação basal desses microRNAs, nesse contexto celular. Em contraste, a expressão de miR-146a foi consideravelmente menor na linhagem portadora de mutação em *BRCA1*, quando comparada à linhagem triplo-negativa com *BRCA1* funcional, resultado que pode motivar futuras investigações sobre essa relação molecular e eventuais aspectos de translação para o contexto clínico.

Um estudo avaliando dados de microarranjos revelou que diversos miRNAs são diferencialmente regulados pelo gene *BRCA1*, dentre eles, miR-146a. Há expressiva variação de expressão de miR-146a em função dos níveis de *BRCA1*, além de sua função reconhecida como supressor tumoral. Ensaio funcionais demonstraram que *BRCA1* se liga diretamente ao promotor do miR-146a, promovendo a sua transcrição. A expressão desse miRNA está significativamente aumentada em células com *BRCA1* funcional, em comparação àquelas com *BRCA1* mutado, sugerindo que *BRCA1* atua na regulação transcricional e não na regulação pós-transcricional do miR-146a (129,130).

A análise do perfil basal de expressão gênica de *PARP1* demonstrou níveis significativamente mais elevados nas linhagens de câncer de mama triplo-negativas, quando comparadas à linhagem hormônio-positiva. Esse padrão foi observado de forma consistente nas duas linhagens TNBC avaliadas, independentemente da competência funcional para *BRCA1*. A ausência de diferença significativa na expressão de *PARP1* entre as linhagens MDA-MB-231 (*BRCA1* funcional) e MDA-MB-436 (*BRCA1* mutado) sugere que sua função compensatória em células com deficiência na via de reparo por recombinação homóloga não está necessariamente associada à expressão basal do gene. Assim, a atividade funcional da enzima *PARP1*, mais do que sua abundância, pode ser determinante na manutenção da integridade genômica em contextos de deficiência na via de *BRCA1*, hipótese que merece ser explorada em estudos futuros para melhor entendimento da biologia tumoral.

Os tumores de mama triplo-negativos frequentemente apresentam deficiência na via de Reparo por Recombinação Homóloga (HRD), tradicionalmente vinculada a

mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Entretanto, estudos recentes reforçam a hipótese de que a heterogeneidade molecular do TNBC pode resultar em quadros de deficiência nessa via de reparo, mesmo em casos sem mutações germinativas em *BRCA1/2*. Esses achados podem ser interpretados à luz do conceito de “*BRCAness*”, em que células com *BRCA* funcional exibem fenótipo semelhante ao de células com *BRCA* mutado. Pan *et al.* identificaram, por meio de um classificador baseado em expressão gênica, que aproximadamente um terço dos casos de TNBC em uma coorte asiática apresentavam um perfil compatível com alta HRD, independentemente do status de *BRCA* (131,132).

Outro estudo demonstrou que a inativação de *BRCA1* (por mutação, hipermetilação do promotor ou *knockdown*) eleva os níveis de *PARP1* e sua atividade dependente de NAD, enquanto sua superexpressão leva à diminuição destes parâmetros. Esse mecanismo de *crosstalk* sugere que a alta expressão de *PARP1* observada em TNBCs pode refletir uma resposta compensatória à deficiência funcional de *BRCA1*, mesmo quando geneticamente íntegro. Os autores propõem ainda que a hiperatividade de *PARP1* induzida pela perda de *BRCA1* pode suprimir sua própria transcrição via depleção de NAD, estabelecendo um ciclo de retroalimentação que perpetua o desequilíbrio nos mecanismos de reparo. Essa dependência aumentada de *PARP1* está alinhada com a eficácia que inibidores de PARP apresentam nesse subtipo tumoral (133).

Considerando as limitações previamente discutidas em relação às dificuldades enfrentadas na translação de dados pré-clínicos para a prática clínica, optou-se por ampliar a investigação do potencial dos miRNAs como biomarcadores preditivos. Para isso, foram analisadas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo, com o objetivo de avaliar a associação entre o níveis de expressão dos miRNAs e a obtenção de resposta patológica completa (pCR) após quimioterapia neoadjuvante. Além disso, foram conduzidas análises *in silico* utilizando dados do consórcio TCGA, com o objetivo de investigar a associação entre a expressão de miRNAs em pacientes com TNBC e desfechos clínicos favoráveis, incluindo o Intervalo Livre de Progressão (PFI) e a Sobrevida Específica da Doença (DSS).

Pacientes diagnosticadas com TNBC podem apresentar, inicialmente, uma resposta favorável à quimioterapia, especialmente à base de antraciclinas e/ou taxanos. Entretanto, quase metade das pacientes diagnosticadas em estágios iniciais

(I e III) apresentam recorrência da doença nos primeiros cinco anos após o tratamento, e aproximadamente 37% evoluem para óbito. Após esse período, observa-se uma redução acentuada nas taxas de recorrência, seguida de estabilização ao longo do tempo (31,112,134).

Nesse sentido, há uma necessidade evidente de aprofundar o conhecimento sobre novos marcadores prognósticos e preditivos, fundamentais para auxiliar no diagnóstico, estratificação de risco, subclassificação da doença, predição da resposta terapêutica e monitoramento clínico, a fim de viabilizar o manejo personalizado do câncer de mama em contextos primário e metastático (105,135).

A identificação de biomarcadores preditivos que possam aprimorar o diagnóstico precoce e a eficácia terapêutica tem direcionado a atenção para assinaturas moleculares presentes em amostras não invasivas, como sangue, ainda na ausência de manifestações clínicas da doença. No câncer de mama, diversos miRNAs têm sido recorrentemente identificados como elementos desregulados, tanto em tecidos tumorais quanto em fluidos biológicos como soro e plasma (136,137). Devido à sua elevada estabilidade, podendo ser analisados em amostras não invasivas, como sangue, soro e urina, os miRNAs emergem como biomarcadores promissores para diagnóstico precoce, estratificação prognóstica e monitoramento da progressão tumoral (138).

Estima-se que cerca de um terço dos genes codificadores de proteínas esteja sob regulação pós-transcricional mediada por miRNAs, os quais desempenham funções essenciais em processos celulares fundamentais, como crescimento celular e morte programada (138). Além disso, um único miRNA tem a capacidade de regular, direta ou indiretamente, centenas de RNAs mensageiros, estabelecendo uma rede complexa que coordena diversos processos celulares e exerce um impacto significativo na biologia tumoral. Em função dessa complexidade, a classificação dos miRNAs como supressores tumorais ou oncogenes vem sendo reavaliada, uma vez que estudos recentes indicam que alguns miRNAs podem desempenhar funções duplas, atuando tanto na promoção do crescimento tumoral, invasão e metástase, quanto suprimindo o crescimento e a progressão tumoral, dependendo do contexto celular (84,139–142). Diante disso, torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimentos de estudos com amostras clínicas para entendimento dessa dualidade funcional.

A análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) é uma ferramenta

estatística amplamente utilizada na avaliação de biomarcadores prognósticos, permitindo medir a capacidade de um teste ou modelo em distinguir entre diferentes desfechos clínicos. Seu desempenho discriminativo tem por base a relação entre sensibilidade e especificidade em diferentes pontos de corte. A área sob a curva (AUC) resume a acurácia global do modelo em distinguir entre os desfechos avaliados. Valores de AUC iguais a 0,5 indicam ausência de poder discriminativo, enquanto valores próximos de 1,0 denotam alto grau de acurácia preditiva. No contexto clínico, AUCs inferiores a 0,6 são considerados de utilidade limitada, ao passo que valores superiores a 0,75 sugerem desempenho prognóstico ou preditivo relevante (143).

A acurácia preditiva da assinatura de miRNAs isolados de biópsias tumorais proposta neste estudo, composta por miR-7, miR-21 e miR-146a, foi avaliada por meio de análise da curva ROC, considerando tanto os perfis de expressão individual quanto a combinação integrada dos três miRNAs. A análise combinada demonstrou desempenho superior em comparação aos marcadores avaliados isoladamente, com alta capacidade discriminatória para distinguir pacientes com ou sem resposta patológica completa (pCR), apresentando sensibilidade e especificidade balanceadas. A diferença estatisticamente significativa entre os grupos reforça o potencial da assinatura como ferramenta preditiva de resposta terapêutica no câncer de mama.

Em síntese, os resultados revelam uma correlação inversa entre os níveis de expressão da assinatura de miRNAs e a resposta ao tratamento. Pacientes que atingiram resposta patológica completa (pCR) apresentaram menores níveis de expressão, enquanto as que não atingiram a resposta (NpCR) exibiram expressão aumentada. Esse perfil sugere que a superexpressão da assinatura está associada à resistência terapêutica, destacando seu potencial como biomarcador preditivo para a estratificação de pacientes e a personalização das abordagens terapêuticas. Tais achados estão em consonância com os objetivos do estudo, que visam à futura translação desses miRNAs como biomarcadores de aplicabilidade clínica.

O projeto “Atlas Genômico do Câncer” (TCGA) utilizou abordagens de sequenciamento genômico em larga escala e análises bioinformáticas avançadas com o objetivo de catalogar mutações associadas ao câncer humano em grandes coortes de pacientes. Os conjuntos de dados gerados por esse consórcio estão disponibilizados publicamente e representam uma fonte relevante de informação para

pesquisas translacionais e investigações sobre os mecanismos de oncogênese em diversos tipos de câncer (144).

O PAM50 (*Predictor Analysis of Microarray 50*) é um ensaio de expressão gênica aprovado pela FDA em 2013, desenvolvido para classificar os subtipos intrínsecos do câncer de mama em luminal A, luminal B, HER2-enriquecido e basal-like, com base na expressão de 58 genes. Reconhecido como preditor independente de características clinicopatológicas, o teste fornece informações adicionais sobre a biologia tumoral, incluindo níveis de proliferação celular e expressão de genes luminais. Além disso, gera escores de risco de recorrência (RoR), estratificados em baixo e alto risco, que orientam decisões terapêuticas em abordagens de medicina personalizada (135).

No presente estudo, utilizamos dados provenientes do TCGA para estudo dos miRNAs de interesse, visando posterior análise das curvas ROC. Evidenciou-se que a expressão de miR-146a em pacientes com câncer de mama triplo-negativo apresenta acurácia estatisticamente significativa na discriminação entre os grupos com e sem ocorrência dos desfechos clínicos Intervalo Livre de Progressão (PFI) e Sobrevida Específica da Doença (DSS). De forma semelhante, a análise da expressão combinada de miR-146a e miR-21 também demonstrou capacidade discriminatória significativa para os mesmos desfechos. Em ambas as abordagens, níveis elevados de expressão dos miRNAs analisados estiveram associados a um prognóstico mais favorável, refletindo menor incidência de progressão tumoral e redução da mortalidade pelo câncer de mama. Este achado é criticamente importante na clínica oncológica e poderá ser explorado em ensaios futuros para validação dos biomarcadores.

Em consonância com os resultados anteriores, a análise das curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier demonstrou que a expressão combinada de miR-7, miR-21 e miR-146a apresenta valor preditivo para o desfecho PFI, sendo que pacientes com baixa expressão desses miRNAs apresentaram risco 3,4 vezes maior de progressão da doença em comparação àquelas com alta expressão. No que se refere ao miR-146a isoladamente, observou-se associação significativa com o desfecho DSS, sendo que a baixa expressão deste miRNA esteve relacionada a um risco aproximado 13 vezes maior de óbito por câncer de mama. Adicionalmente, a expressão combinada de miR-146a e miR-21 também demonstrou valor preditivo para o DSS, sendo que pacientes com baixa expressão apresentaram risco 10,8 vezes superior de morte específica pela doença. Esses resultados reforçam o potencial

prognóstico dos miRNAs avaliados, especialmente do miR-146a, tanto de forma isolada quanto em combinação com outros miRNAs.

Quanto ao miR-7, estudos demonstraram uma correlação negativa entre seus níveis e parâmetros clínicos desfavoráveis, como estágio avançado, maior grau histológico e redução da sobrevida (94,145). Contudo, evidências adicionais indicam que a expressão elevada de miR-7 está associada a um pior prognóstico no câncer de mama. Esses achados aparentemente contraditórios sugerem que a expressão de miR-7 pode variar entre diferentes subpopulações celulares dentro do microambiente tumoral, evidenciando a complexidade regulatória dos miRNAs e reforçando a necessidade de abordagens contextuais para a interpretação de seus efeitos biológicos (91,146).

Estudos anteriores também investigaram o microRNA miR-21. Foi identificado que sua superexpressão tem sido correlacionada a um prognóstico clínico desfavorável em pacientes com câncer de mama, estando associada a maior agressividade tumoral e menor resposta terapêutica. Evidências recentes apontam que a redução dos níveis de miR-21 ao longo do tratamento neoadjuvante pode estar relacionada a desfechos clínicos mais favoráveis, sugerindo seu potencial como marcador preditivo de resposta terapêutica. Em outro estudo, uma metanálise abrangente, observou-se que pacientes que apresentaram elevação nos níveis de miR-21 desde o início até o segundo ciclo ou conclusão de tratamento, exibiram menor Sobrevida Livre de Doença (DFS) em comparação àqueles com expressão decrescente ao longo do regime terapêutico. Entretanto, as análises indicaram alta heterogeneidade entre os estudos, com essa associação da expressão de miR-21 não se replicando em relação aos demais desfechos, como Sobrevida Global (OS) (147,148).

A associação consistente entre alta expressão e melhores desfechos clínicos, observada neste estudo, sugere que esses marcadores podem contribuir para a estratificação de risco em pacientes com TNBC, auxiliando na identificação de subgrupos com maior probabilidade de resposta favorável ao tratamento e melhor evolução clínica. Em estudos anteriores com amostras clínicas, observou-se uma correlação positiva robusta entre os níveis de expressão de miR-146a e *BRCA1*, sugerindo uma possível correlação funcional com impacto na biologia tumoral (129).

Outros estudos demonstraram que pacientes com baixos níveis de expressão de miR-146a apresentaram expectativa significativamente reduzida de Sobrevida

Global (OS) e Sobrevida Livre de Doença (DFS), em comparação àqueles com alta expressão do referido microRNA. Modelos multivariados de regressão de Cox proporcional revelaram a capacidade do miR-146a em prever a recorrência da doença de forma independente de variáveis clínicas tradicionais, como tamanho tumoral, status linfonodal, grau histológico e idade dos pacientes, destacando o miR-146a como um preditor molecular independente para desfechos clínicos no TNBC (105,106).

Em conjunto, os resultados obtidos reforçam a complexidade da resposta tumoral à quimioterapia, evidenciando a influência determinante do contexto molecular sobre os desfechos terapêuticos. Apesar dessa heterogeneidade, observou-se a viabilidade do desenvolvimento de assinaturas baseadas em perfis de microRNAs, com potencial tanto preditivo de resposta terapêutica quanto prognóstico de desfechos clínicos. A validação dessas assinaturas em estudos multicêntricos futuros será essencial para sua consolidação como ferramentas biomoleculares aplicáveis à prática clínica, contribuindo significativamente para o avanço da medicina de precisão no manejo do câncer de mama triplo-negativo.

6 CONCLUSÃO

As análises *in vitro* evidenciam diferenças significativas na expressão basal de miR-7, miR-21, miR-671 e miR-146a entre linhagens hormônio-positivas e triplo-negativas, com destaque para a variabilidade de miR-146a entre as linhagens do mesmo subtipo TNBC.

Os miRNAs miR-7, miR-21 e miR-146a respondem ao tratamento com paclitaxel, indicando sensibilidade à modulação farmacológica.

A expressão de *PARP1* é significativamente maior nas linhagens triplo-negativas, sugerindo associação com esse subtipo molecular.

Em amostras clínicas primárias de TNBC, a assinatura combinada de miR-7, miR-21 e miR-146a apresenta valor preditivo para resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante.

As análises *in silico* demonstram que miR-146a, isoladamente ou em combinação com miR-21, associa-se significativamente aos desfechos clínicos de Intervalo Livre de Progressão e Sobrevida Específica da Doença. Adicionalmente, a baixa expressão combinada de miR-7, miR-21 e miR-146a indica maior risco de progressão da doença.

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos, conclui-se que os miRNAs analisados desempenham um papel funcional relevante na biologia do câncer de mama triplo-negativo, com potencial aplicação como biomarcadores preditivos de resposta terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May 4;74(3):229–63.
2. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. 2023.
3. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Oct 3;121(10):3797–803.
4. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*. 2017 Nov;3(11):753–60.
5. Robbins SL, Cotran RS. Robbins & Cotran, bases patológicas das doenças. 8a Edição. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto, Jon C. Aster, editors. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda.; 2010.
6. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*. 2014 Jul 31;465(1):1–14.
7. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020 Aug;77(2):181–5.
8. Jenkins S, Kachur ME, Rechache K, Wells JM, Lipkowitz S. Rare Breast Cancer Subtypes. *Curr Oncol Rep*. 2021 Mar 23;23(5):54.
9. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*. 2010 Aug 30;12(4):207.
10. El Hejjoui B, Lamrabet S, Amrani Joutei S, Senhaji N, Bouhafa T, Malhouf MA, et al. New Biomarkers and Treatment Advances in Triple-Negative Breast Cancer. *Diagnostics*. 2023 Jun 2;13(11):1949.
11. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu S cang. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020 Dec 9;22(1):61.
12. Marra A, Trapani D, Viale G, Criscitiello C, Curigliano G. Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *NPJ Breast Cancer*. 2020 Oct 16;6(1):54.

13. Chaudhary LN, Wilkinson KH, Kong A. Triple-Negative Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Jan;27(1):141–53.
14. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Nov 17;13(11):674–90.
15. Asleh K, Riaz N, Nielsen TO. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2022 Sep 1;41(1):265.
16. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jul 1;121(7):2750–67.
17. Tong L, Yu X, Wang S, Chen L, Wu Y. Research Progress on Molecular Subtyping and Modern Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2023 Aug;Volume 15:647–58.
18. Xiong X, Zheng LW, Ding Y, Chen YF, Cai YW, Wang LP, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. *Signal Transduct Target Ther*. 2025 Feb 19;10(1):49.
19. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016 Jun 16;11(6):e0157368.
20. Sukumar J, Gast K, Quiroga D, Lustberg M, Williams N. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2021 Feb 1;21(2):135–48.
21. Han Y, Wei L. Novel clinical potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer: Mechanistic insights and clinical applications (Review). *Oncol Lett*. 2025 Mar 4;29(5):1–14.
22. Sharma P. Update on the Treatment of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2018 May 14;19(5):22.
23. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment. *JAMA*. 2019 Jan 22;321(3):288.
24. Gerratana L, Fanotto V, Pelizzari G, Agostinetto E, Puglisi F. Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? *Cancer Treat Rev*. 2016 Jul;48:34–41.

25. Teraoka S, Sato E, Narui K, Yamada A, Fujita T, Yamada K, et al. Neoadjuvant Chemotherapy With Anthracycline-Based Regimen for BRCAness Tumors in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Surgical Research*. 2020 Jun;250:143–7.
26. Mulligan JM, Hill LA, Deharo S, Irwin G, Boyle D, Keating KE, et al. Identification and Validation of an Anthracycline/Cyclophosphamide–Based Chemotherapy Response Assay in Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2014 Jan;106(1).
27. Lee JS, Yost SE, Yuan Y. Neoadjuvant Treatment for Triple Negative Breast Cancer: Recent Progresses and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2020 May 29;12(6):1404.
28. Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2020 Mar 9;50(3):225–9.
29. Hassan. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncol Rep*. 2010 Sep 27;24(5).
30. Gadi VK, Davidson NE. Practical Approach to Triple-Negative Breast Cancer. *J Oncol Pract*. 2017 May;13(5):293–300.
31. Costa RLB, Gradishar WJ. Triple-Negative Breast Cancer: Current Practice and Future Directions. *J Oncol Pract*. 2017 May;13(5):301–3.
32. Yang CP, Horwitz S. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 9;18(8):1733.
33. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014 Sep 15;25(18):2677–81.
34. Profissional B, Saúde DA. ONTAX ® Libbs Farmacêutica Ltda. Solução injetável 6 mg/mL.
35. Chmielewski NN, Limoli CL. Sex Differences in Taxane Toxicities. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022;14(14). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35884386>
36. Mustacchi G, De Laurentiis M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Aug;4303.
37. Li Y, Li W, Lin J, Lv C, Qiao G. miR-146a Enhances the Sensitivity of Breast Cancer Cells to Paclitaxel by Downregulating IRAK1. *Cancer Biother Radiopharm*. 2022 Oct 1;37(8):624–35.
38. LIANG Z, XI Y. MicroRNAs mediate therapeutic and preventive effects of natural agents in breast cancer. *Chin J Nat Med*. 2016 Dec;14(12):881–7.

39. Alves RC, Fernandes RP, Eloy JO, Salgado HRN, Chorilli M. Characteristics, Properties and Analytical Methods of Paclitaxel: A Review. *Crit Rev Anal Chem*. 2018 Mar 4;48(2):110–8.
40. Chen D, Bao C, Zhao F, Yu H, Zhong G, Xu L, et al. Exploring Specific miRNA-mRNA Axes With Relationship to Taxanes-Resistance in Breast Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:1397.
41. Leon-Ferre RA, Goetz MP. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer. *BMJ*. 2023 May 30;e071674.
42. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition <scp>AJCC</scp> Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar 17;67(2):93–9.
43. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, Boughey JC, Coles C, Curigliano G, et al. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Annals of Oncology*. 2015 Jul;26(7):1280–91.
44. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Modern Pathology*. 2015 Sep;28(9):1185–201.
45. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Oct 1;25(28):4414–22.
46. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, et al. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *Journal of Clinical Oncology*. 2017 Apr 1;35(10):1049–60.
47. Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J, Abramson V, Aft R, Agnese D, et al. Breast Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2024 Jul;22(5):331–57.
48. Drucker E, Krapfenbauer K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *EPMA Journal*. 2013 Dec 25;4(1):7.
49. Ma Y, Gamagedara S. Biomarker Analysis for Oncology. *Biomark Med*. 2015 Sep 2;9(9):845–50.

50. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers—A General Review. *Curr Protoc Pharmacol*. 2017 Mar 17;76(1).
51. Brabletz T, Lyden D, Steeg PS, Werb Z. Roadblocks to translational advances on metastasis research. *Nat Med*. 2013 Sep;19(9):1104–9.
52. Tsimberidou AM, Fountzilas E, Nikanjam M, Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev*. 2020 Jun;86:102019.
53. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106535.
54. Tarighati E, Keivan H, Mahani H. A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. *Clin Exp Med*. 2022 Jan 15;
55. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015 Jun;4(3):256–69.
56. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
58. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Recio MJ, Darband SG, Kaviani M, Safa A, Mihanfar A, et al. DNA damage response and breast cancer development: Possible therapeutic applications of ATR, ATM, PARP, BRCA1 inhibition. *DNA Repair (Amst)*. 2021 Feb;98:103032.
59. Huang Y, Wei S, Hu K, Xiang X. Knowledge mapping of global trends in DNA damage repair-related breast cancer research: a bibliometric study. *Front Oncol*. 2025 May 29;15.
60. Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt AN. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Research*. 2014 Jun 3;16(3):211.
61. VOUTSADAKIS IA, STRAVODIMOU A. Homologous Recombination Defects and Mutations in DNA Damage Response (DDR) Genes Besides *BRCA1* and *BRCA2* as Breast Cancer Biomarkers for PARP Inhibitors and Other DDR Targeting Therapies. *Anticancer Res*. 2023 Mar 28;43(3):967–81.
62. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):287–94.

63. Qu Y, Qin S, Yang Z, Li Z, Liang Q, Long T, et al. Targeting the DNA repair pathway for breast cancer therapy: Beyond the molecular subtypes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Dec;169:115877.
64. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016 Feb 18;16(2):110–20.
65. Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. Homologous recombination deficiency and ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2016 Jun;60:49–58.
66. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):814–9.
67. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2014;24(1):15–28.
68. El Hejjoui B, Lamrabet S, Amrani Joutei S, Senhaji N, Bouhafa T, Malhouf MA, et al. New Biomarkers and Treatment Advances in Triple-Negative Breast Cancer. *Diagnostics*. 2023 Jun 2;13(11):1949.
69. Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. Vol. 289, *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 2013–24.
70. Gupte R, Liu Z, Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. 2017; Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.291518>.
71. Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol Cell*. 2010 Jul;39(1):8–24.
72. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012 Dec 23;12(12):801–17.
73. Luo L, Keyomarsi K. PARP inhibitors as single agents and in combination therapy: the most promising treatment strategies in clinical trials for BRCA-mutant ovarian and triple-negative breast cancers. *Expert Opin Investig Drugs*. 2022 Jun 3;31(6):607–31.
74. Hopkins JL, Lan L, Zou L. DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities. *Genes Dev*. 2022 Mar 1;36(5–6):278–93.
75. Murai J, Huang S yin N, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5588–99.

76. Kim Y, Kim A, Sharip A, Sharip A, Jiang J, Yang Q, et al. Reverse the Resistance to PARP Inhibitors. *Int J Biol Sci.* 2017;13(2):198–208.
77. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Gene Ther.* 2018 May 1;18(3):143–53.
78. Lovat F, Valeri N, Croce CM. MicroRNAs in the Pathogenesis of Cancer. *Semin Oncol.* 2011 Dec;38(6):724–33.
79. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2014. p. 509–24.
80. Fareh M, Yeom KH, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun.* 2016 Dec 9;7:13694.
81. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Vol. 136, *Cell.* 2009. p. 642–55.
82. Galvão-Lima LJ, Morais AHF, Valentim RAM, Barreto EJSS. miRNAs as biomarkers for early cancer detection and their application in the development of new diagnostic tools. Vol. 20, *BioMedical Engineering Online.* BioMed Central Ltd; 2021.
83. Kalkusova K, Taborska P, Stakheev D, Smrz D. The Role of miR-155 in Antitumor Immunity. *Cancers (Basel).* 2022 Nov 3;14(21):5414.
84. Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* 2016 Mar 1;6(3):235–46.
85. Mashima R. Physiological roles of miR-155. *Immunology.* 2015 Jul 1;145(3):323–33.
86. Castañeda CA, Agullo-Ortuño MT, Fresno Vara JA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos E. Implication of miRNA in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011 Aug 10;11(8):1265–75.
87. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer.* 2013 Apr 14;132(7):1602–12.
88. Zhao J, Tao Y, Zhou Y, Qin N, Chen C, Tian D, et al. MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer Cell Int.* 2015 Dec 29;15(1):103.
89. Mirzaei Z, Barati T, Ebrahimi A, Derakhshan SM, Khaniani MS. The role of mir-7-5p in cancer: function, prognosis, diagnosis, and therapeutic implications. *Mol Biol Rep.* 2025 Dec 25;52(1):12.

90. Moazzeni H, Najafi A, Khani M. Identification of direct target genes of miR-7, miR-9, miR-96, and miR-182 in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Cell Probes*. 2017 Aug;34:45–52.
91. Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, et al. miR-7 Suppresses Brain Metastasis of Breast Cancer Stem-Like Cells By Modulating KLF4. *Cancer Res*. 2013 Feb 15;73(4):1434–44.
92. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* (1979). 2001 Oct 26;294(5543):853–8.
93. Zhang Z, Zhang H, Yu J, Xu L, Pang X, Xiang Q, et al. miRNAs as therapeutic predictors and prognostic biomarkers of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2022 Aug 21;194(3):483–505.
94. Raychaudhuri M, Bronger H, Buchner T, Kiechle M, Weichert W, Avril S. MicroRNAs miR-7 and miR-340 predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Apr 8;162(3):511–21.
95. Cui S, Wang R, Chen L. MicroRNAs: key players of taxane resistance and their therapeutic potential in human cancers. *J Cell Mol Med*. 2013 Oct 23;17(10):1207–17.
96. Syed RU, Banu H, Alshammrani A, Alshammari MD, G SK, Kadimpati KK, et al. MicroRNA-21 (miR-21) in breast cancer: From apoptosis dysregulation to therapeutic opportunities. *Pathol Res Pract*. 2024 Oct;262:155572.
97. Chen J, Wang X. MicroRNA-21 in breast cancer: diagnostic and prognostic potential. *Clinical and Translational Oncology*. 2014 Mar 19;16(3):225–33.
98. Baylie T, Kasaw M, Getinet M, Getie G, Jemal M, Nigatu A, et al. The role of miRNAs as biomarkers in breast cancer. Vol. 14, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media SA; 2024.
99. Li S, Yang X, Yang J, Zhen J, Zhang D. Serum microRNA-21 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med*. 2016 Feb 17;16(1):29–35.
100. Iorio M V., Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065–70.
101. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122–43.

102. Iacona JR, Lutz CS. miR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer. *WIREs RNA*. 2019 Jul 20;10(4).
103. Tebbi L, Mansoori B, Safaei S, Hashemzadeh S, Shirmohamadi M, Hajiasgharzadeh K, et al. MiR-146a Restoration Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Cell Migration: A Bioinformatic and In Vitro Study. *Adv Pharm Bull*. 2022 Aug;12(4):842–9.
104. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF- κ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(42):5643–7.
105. Panoutsopoulou K, Liu Y, Avgeris M, Dreyer T, Dorn J, Magdolen V, et al. Repression of miR-146a in predicting poor treatment outcome in triple-negative breast cancer. *Clin Biochem*. 2023 Apr;114:43–51.
106. Zavala V, Pérez-Moreno E, Tapia T, Camus M, Carvallo P. miR-146a and miR-638 in BRCA1-deficient triple negative breast cancer tumors, as potential biomarkers for improved overall survival. *Cancer Biomarkers*. 2016 Jan 18;16(1):99–107.
107. MINISTÉRIO DA SAÚDE DIRETRIZES METODOLÓGICAS ELABORAÇÃO DE DIRETRIZES CLÍNICAS [Internet]. Available from: www.gov.br/conitec/pt-br/
108. Liu K, Lu ZZ, He ZY, Wu SG. Gender Disparities in Breast Cancer Survival According to Clinical Treatment Score Post-5 Years (CTS5) Risk Stratification. *Cancer Res Treat*. 2025 May 27;
109. Wilson MK, Karakasis K, Oza AM. Outcomes and endpoints in trials of cancer treatment: the past, present, and future. *Lancet Oncol*. 2015 Jan;16(1):e32–42.
110. Basmadjian RB, Chow K, Kim D, Kenney M, Lukmanji A, O'Sullivan DE, et al. The Association between Early-Onset Diagnosis and Clinical Outcomes in Triple-Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 23;15(7):1923.
111. Wang Z, Wang T, Xie Y, Li X, Du D, Li R. Unraveling the role of adjuvant chemotherapy in elderly triple-negative breast cancer: Insights from competing risk analysis using SEER data. *Cancer Epidemiol*. 2025 Aug;97:102853.
112. Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, Hsu L, Moulder SL, Tripathy D, et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. *Br J Cancer*. 2018 Jan 12;118(1):17–23.

113. Lin B, Wang K, Yuan Y, Wang Y, Liu Q, Wang Y, et al. A novel approach to the analysis of Overall Survival (OS) as response with Progression-Free Interval (PFI) as condition based on the RNA-seq expression data in The Cancer Genome Atlas (TCGA). *BMC Bioinformatics*. 2024 Sep 13;25(1):300.
114. St Laurent J, Liu JF. Treatment Approaches for Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2024 Jan 10;42(2):127–33.
115. Liang H, Huang W, Wang Y, Ding L, Zeng L. Overexpression of MiR-146a-5p Upregulates lncRNA HOTAIR in Triple-Negative Breast Cancer Cells and Predicts Poor Prognosis. *Technol Cancer Res Treat*. 2019;18:1533033819882949.
116. Si C, Yu Q, Yao Y. Effect of miR-146a-5p on proliferation and metastasis of triple-negative breast cancer via regulation of SOX5. *Exp Ther Med*. 2018 Mar 9;
117. Kaur R, Sharma A, Wijekoon N. Breast cancer preclinical models: a vital resource for comprehending disease mechanisms and therapeutic development. *EXCLI J*. 2025;24:267–85.
118. Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev*. 2012 Nov;38(7):890–903.
119. Maloney SM, Hoover CA, Morejon-Lasso L V., Prosperi JR. Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 10;12(11):3323.
120. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
121. Fu SW, Lee W, Coffey C, Lean A, Wu X, Tan X, et al. miRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection following mammography. *Cell Biosci*. 2016 Dec 26;6(1):6.
122. Skourti E, Volpe A, Lang C, Johnson P, Panagaki F, Fruhwirth GO. Spatiotemporal quantitative microRNA-155 imaging reports immune-mediated changes in a triple-negative breast cancer model. *Front Immunol*. 2023 Jun 8;14.
123. Miyamoto M, Sawada K, Nakamura K, Yoshimura A, Ishida K, Kobayashi M, et al. Paclitaxel exposure downregulates miR-522 expression and its downregulation induces paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 2020 Oct 7;10(1):16755.
124. Pal B, Chen Y, Bert A, Hu Y, Sheridan JM, Beck T, et al. Integration of microRNA signatures of distinct mammary epithelial cell types with their gene expression and epigenetic portraits. *Breast Cancer Research*. 2015 Jun 18;17(1):85.

125. Corrêa S, Lopes FP, Panis C, Basili T, Binato R, Abdelhay E. miRNome Profiling Reveals Shared Features in Breast Cancer Subtypes and Highlights miRNAs That Potentially Regulate MYB and EZH2 Expression. *Front Oncol.* 2021 Sep 27;11.
126. Gasparini P, Cascione L, Fassan M, Lovat F, Guler G, Balci S, et al. microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget.* 2014 Mar 15;5(5):1174–84.
127. Adhami M, MotieGhader H, Haghdoust AA, Afshar RM, Sadeghi B. Gene co-expression network approach for predicting prognostic microRNA biomarkers in different subtypes of breast cancer. *Genomics.* 2020 Jan;112(1):135–43.
128. Abohalawa BY, Shaath H, Elango R, Vishnubalaji R, Rashid S, Al-Sarraf R, et al. MicroRNAome profiling of breast cancer unveils hsa-miR-5683 as a tumor suppressor microRNA predicting favorable clinical outcome. *Cancer Cell Int.* 2024 Nov 13;24(1):377.
129. Kumaraswamy E, Wendt KL, Augustine LA, Stecklein SR, Sibala EC, Li D, et al. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene.* 2015 Aug 13;34(33):4333–46.
130. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS, et al. Down-regulation of *BRCA1* expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med.* 2011 May 5;3(5):279–90.
131. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science.* 2017 Mar 17;355(6330):1152–8.
132. Pan JW, Tan ZC, Ng PS, Zabidi MMA, Nur Fatin P, Teo JY, et al. Gene expression signature for predicting homologous recombination deficiency in triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2024 Jul 19;10(1):60.
133. Li D, Bi FF, Chen NN, Cao JM, Sun WP, Zhou YM, et al. A novel crosstalk between BRCA1 and poly (ADP-ribose) polymerase 1 in breast cancer. *Cell Cycle.* 2014 Nov 29;13(21):3442–9.
134. Januškevičienė I, Petrikaitė V. Interaction of phenotypic sublines isolated from triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 modulates their sensitivity to paclitaxel and doxorubicin in 2D and 3D assays. *Am J Cancer Res.* 2023;13(8):3368–83.
135. Sarhangi N, Hajjari S, Heydari SF, Ganjizadeh M, Rouhollah F, Hasanzad M. Breast cancer in the era of precision medicine. *Mol Biol Rep.* 2022 Oct 22;49(10):10023–37.

136. Mihai AM, Ianculescu LM, Suci N. MiRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection: a systematic review. *J Med Life* [Internet]. 2024 Jun;17(6):549–54. Available from: <https://medandlife.org/all-issues/2024/issue-6-2024/review-issue-6-2024/mirnas-as-potential-biomarkers-in-early-breast-cancer-detection-a-systematic-review/>
137. Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JPA. Clinical Outcome Prediction by MicroRNAs in Human Cancer: A Systematic Review. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2012 Apr 4;104(7):528–40.
138. Pankotai-Bodó G, Oláh-Németh O, Sükösd F, Pankotai T. Routine molecular applications and recent advances in breast cancer diagnostics. *J Biotechnol*. 2024 Jan;380:20–8.
139. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb;391(6669):806–11.
140. Muñoz JP, Pérez-Moreno P, Pérez Y, Calaf GM. The Role of MicroRNAs in Breast Cancer and the Challenges of Their Clinical Application. *Diagnostics*. 2023 Sep 28;13(19):3072.
141. Sukumar J, Gast K, Quiroga D, Lustberg M, Williams N. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2021 Feb 1;21(2):135–48.
142. Takahashi RU, Prieto-Vila M, Kohama I, Ochiya T. Development of miRNA-based therapeutic approaches for cancer patients. *Cancer Sci*. 2019 Apr;110(4):1140–7.
143. Taylor JMG, Ankerst DP, Andridge RR. Validation of Biomarker-Based Risk Prediction Models. *Clinical Cancer Research*. 2008 Oct 1;14(19):5977–83.
144. Tian B, Hou M, Zhou K, Qiu X, Du Y, Gu Y, et al. A Novel TCGA-Validated, MiRNA-Based Signature for Prediction of Breast Cancer Prognosis and Survival. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 13;9.
145. Cui YX, Bradbury R, Flamini V, Wu B, Jordan N, Jiang WG. MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2017 Jun 1;117(1):89–101.
146. Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, de Weerd V, Boersma AWM, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):13021–6.

147. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* [Internet]. 2008;14(11):2348–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18812439>
148. Wang Y, Zhang Y, Pan C, Ma F, Zhang S. Prediction of Poor Prognosis in Breast Cancer Patients Based on MicroRNA-21 Expression: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Feb 23;10(2):e0118647.