

Importância prognóstica dos níveis transcricionais do gene *TNRC6A* em pacientes com Câncer de Mama**Prognostic relevance of transcriptional levels of *TNRC6A* gene in patients with Breast Cancer**

DOI:10.34117/bjdv6n6-321

Recebimento dos originais: 08/05/2020

Aceitação para publicação: 14/06/2020

Raiane Aparecida dos Santos Machado

Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Uberlândia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Endereço: Rua Major Jerônimo, 566 – Sala 601, Centro, Patos de Minas-MG, Brasil

E-mail: machado.raiane@hotmail.com

Sara Teixeira Soares Mota

Mestre em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Endereço: Rua Major Jerônimo, 566 – Sala 601, Centro, Patos de Minas-MG, Brasil

E-mail: saratsm.s@hotmail.com

Larissa Vargas

Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Uberlândia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Endereço: Rua Major Jerônimo, 566 – Sala 601, Centro, Patos de Minas-MG, Brasil

E-mail: vargaslarissa13@gmail.com

Adriana Freitas Neves

Doutora em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Av. Dr. Lamartine Pinto de Avelar, 1120-Setor Universitário, Catalão-GO, Brasil

E-mail: neves.af@gmail.com

Yara Cristina de Paiva Maia

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Endereço: Av Amazonas S/N Bloco 2E Sala 248, Uberlândia – MG, Brasil

E-mail: yara.maia@ufu.br

Thaise Gonçalves de Araújo

Doutora em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Endereço: Rua Major Jerônimo, 566 – Sala 601, Centro, Patos de Minas-MG, Brasil

E-mail: tgaraujo@ufu.br

RESUMO

O câncer de mama (CAM) é o câncer mais comumente diagnosticado entre as mulheres no mundo ocidental, com um número crescente de óbitos. A busca de marcadores tumorais na avaliação do prognóstico dessa doença tem se tornado crucial para a escolha terapêutica, o que impacta diretamente a sobrevivência das pacientes. A proteína TNRC6A tem sido descrita associada às vias de miRNA, regulando toda a maquinaria celular de células normais e tumorais. O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão dos transcritos do gene *TNRC6A* e sua correlação com a ocorrência e progressão do CAM. Foram coletadas 43 amostras de sangue periférico de pacientes com CAM e 44 com Doença Benigna da Mama (DBM). Em cada amostra foi realizada a transcrição reversa seguida de ensaios de qPCR. Com a análise dos níveis de mRNA verificou-se que não houve uma diferença significativa entre o grupo CAM e DBM. Além disso, os dados de idade, receptores hormonais e proliferação celular também não mostraram associação com o marcador. Contudo, menores níveis foram identificados em pacientes com comprometimento dos gânglios linfáticos axilares, evidenciando a importância do gene *TNRC6A* na progressão de tumores mamários.

Palavras-chave: Câncer de Mama. miRNA. *TNRC6A*, Linfonodos.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common cancer diagnosed among women in the western world with an increasing number of deaths. The search for tumor markers to assess the prognosis of this disease has become crucial for therapeutic choice, which directly impacts the patients' survival. The *TNRC6A* protein has been associated with miRNA pathways, regulating whole cellular machinery of normal and tumor cells. This study aimed to evaluate the transcriptional expression of *TNRC6A* gene and its correlation with the occurrence and progression of BC. Forty three samples were collected from peripheral blood of patients with BC and 44 with Benign Breast Disease (BBD). Reverse transcription was performed in each sample followed by qPCR assays. No difference was observed for *TNRC6A* mRNA levels between BC and BBD groups. Considering age, hormone receptors and cell proliferation there was no association with the marker. However, lower levels were detected in patients with lymph node involvement, indicating the importance of *TNRC6A* gene in the progression of breast tumors.

Keywords: Breast Cancer, miRNA, *TNRC6A*, lymph node.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CAM) é uma das principais causas globais de morte por câncer em mulheres (ZHENG, 2016). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o CAM é o mais incidente no sexo feminino. Para o triênio 2020-2022 são estimados 66.280 novos diagnósticos, o que representa uma taxa de incidência de 61,61 casos por 100.000 brasileiras (INCA, 2020). A capacidade de sustentar a proliferação crônica é indiscutivelmente a característica mais fundamental das células malignas. Os tecidos normais controlam cuidadosamente a produção e liberação de sinais de crescimento que instruem a entrada ou a progressão no ciclo celular. Assim, assegura-se uma homeostase do número de células e a manutenção do funcionamento tecidual (HANAHAN, 2011).

O CAM é uma doença heterogênea e a identificação do envolvimento axilar indica a presença de um tumor biologicamente mais agressivo. Sendo assim, a maioria das pacientes linfonodo-axilares-positivas apresenta uma sobrevida global menor comparada àquelas sem metástase linfonodal (TONELLOTTI, 2019). Avaliar o estado dos gânglios linfáticos axilares é, portanto, fundamental no estadiamento da neoplasia, como também para decidir o planejamento do tratamento e prever a sobrevida da paciente (THOMPSON, 2012). O estado axilar dos linfonodos continua a ser a variável de prognóstico mais importante para a sobrevivência, apesar dos progressos significativos na caracterização molecular e genética de doenças malignas da mama (NERI, 2005; DANKO, 2010). De fato, além da classificação histológica, o CAM também é categorizado molecularmente. A avaliação da expressão de receptores hormonais para estrogênio (ER) e progesterona (PR), e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) são essenciais para a conduta clínica das pacientes (DEN, 2013). Nesse cenário, a identificação de marcadores moleculares de valor prognóstico tem auxiliado na predição da evolução da doença, além de permitir a classificação das pacientes em grupos específicos a determinadas alternativas terapêuticas (KUMAR, 2016). Contudo, devido à natureza multifatorial dos tumores mamários, uma combinação de vários marcadores é necessária para detectar e prever a evolução da lesão de forma eficaz (LI, 2002).

Os miRNAs têm sido propostos como biomarcadores promissores no CAM, detectados em biópsias (SHEN, 2013; BERTOLI, 2015) e encontrados de forma estável nos fluidos corporais, particularmente em sangue, plasma, soro e saliva (QU, 2011; ASHBY, 2014). Além disso, assinaturas moleculares associadas aos miRNAs têm sido relacionadas a diversas variáveis clinicopatológicas, tais como o estadiamento do tumor e o status de seus receptores (SHI, 2010). Diferentes genes já foram descritos regulando miRNAs como: Argonautas (*AGO1* e *2*), Exportina 5 (*XPO5*), Subunidade complexa de carregamento de RISC (*TARBP2*) e o Gene de repetição trinucleotídica contendo 6A (*TNRC6A*) e 6C (*TNRC6C*) (BOLAND, 1998). HEp-2, HeLa, e em muitas outras linhagens de células humanas, a proteína codificada pelo gene *TNRC6A*, é conhecida por estar principalmente localizada nos corpos de processamento (NISHI, 2015). Estes são sítios citoplasmáticos que contêm proteínas envolvidas na degradação do mRNA e seu armazenamento. Análises de imuno-histoquímica de vários cânceres humanos, tais como gástrico, colorretal com alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), próstata e tumores esofágicos, mostraram a forte localização nuclear de *TNRC6A* (KIM, 2010; YOO, 2010). Além disso, ensaios de sequenciamento levaram à identificação de mutações *frameshift* nesse gene, incluindo alterações deletérias ou duplicações de uma única base correlacionadas a diferentes neoplasias (KIM, 2010). Também já

foram descritas diferenças nas expressões de AGO2 e TNRC6A entre células normais e cancerosas de próstata e esôfago. Cerca de 50% das lesões neoplásicas intraepiteliais prostáticas expressam tanto AGO2 e TNRC6A, sugerindo que o aumento de sua expressão pode ocorrer em fase inicial de alguns tumores prostáticos (YOO, 2010).

Nesse contexto, devido ao comportamento do TNRC6A observado em outros tipos de cânceres, tornam-se indispensáveis mais estudos a respeito de sua relação com o CAM na busca por novos marcadores e vias envolvidos em sua biologia. Portanto, o objetivo do presente estudo foi quantificar os níveis transcricionais do gene *TNRC6A* e associá-los a parâmetros clínicos do CAM.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 GRUPO DE ESTUDO

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e pela equipe do Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, sob o número de parecer 064/08. O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional às pacientes. As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos tipo vacutainerTM contendo K₂EDTA 7,2mg e acondicionadas à 4°C.

Foram incluídas no estudo 43 amostras de pacientes com CAM e 44 com Doença Benigna da Mama (DBM). A média das mulheres com CAM foi de 56 anos (de 30 a 89 anos) e das pacientes com DBM foi de 40 anos (de 16 a 72 anos). De acordo com o sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), 8 (17%) e 7 (16%) tumores da mama foram classificados como T1 e T2, respectivamente. Nenhuma lesão apresentou estadiamento T3. Quanto aos receptores hormonais, 34 (79%) pacientes foram positivas para ER e 31 (72%) para PR. A expressão de HER-2 foi considerada como positiva (score 3+) em 10 casos (47%) e negativa (score de 0 a 1+) em 1 (5%) paciente. Os scores 2+ foram excluídos das análises. Para p53, 81% das pacientes eram positivas e 7% eram negativas.

2.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA total das amostras de sangue foi realizada utilizando-se o reagente Trizol LS® (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 1,5 %, por 1 hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com GelRed 1X

(Amersham) e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação ImageSystem – VDS, Amersham Biosciences). Em seguida, o material foi armazenado à -80°C para subseqüentes análises.

2.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E ENSAIOS DE QPCR

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1 μg de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de Tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 μM de dNTPs (Invitrogen) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros (Invitrogen). O volume final de cada reação foi completado para 20 μl com água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e inativação da transcriptase. Reações controle foram preparadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

A PCR em Tempo Real (qPCR) foi realizada após a transcrição reversa. A reação de amplificação foi preparada com o Kit SYBR®Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) contendo: 5 μL de master mix, 0,5 μM dos oligonucleotídeos iniciadores, 2 μL de cDNA e H₂O de injeção para um volume final de 10 μL . Os *primers* utilizados para a detecção dos transcritos do gene *TNRC6A* foram: 5' CAGGGACAGGAACAGTGGGT3' e 5' TGGCTGAAGTGCTTTGTGCT-33' e para o gene de referência, *Beta-2-Microglobulina*, foram: 5'-CCTGCCGTGTGAACCATGT-3' e 5'- GCGGCATCTTCAAACCTCC-3'. Após otimização da curva padrão relativa foi adotado o método Cq comparativo para a quantificação dos transcritos. O aparelho 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) e software foram utilizados para a análise dos resultados. Foram seguidas as condições-padrão de ciclagem que inclui em 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

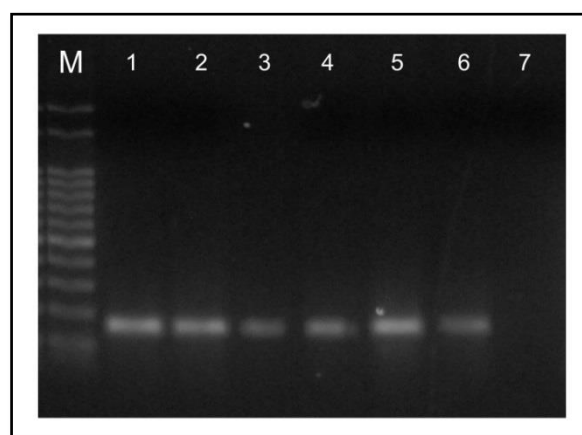
Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney para a comparação das médias dos níveis de expressão do mRNA do gene *TNRC6A* entre os pacientes com CAM e DBM e para comparação com dados clinicopatológicos. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da expressão de genes envolvidos na tumorigênese é a chave para adaptar tratamentos individuais. O estudo de alterações transcricionais pode auxiliar nesse processo, evidenciando eventos moleculares desregulados durante a transformação oncogênica. Nesse contexto, a RT-qPCR pode auxiliar a desvendar novas vias sendo um método amplamente utilizado para fins de diagnóstico (REZAEIJAM, 2015).

Encontram-se descritos exemplos de alterações nas expressões de miRNAs em cânceres humanos (BERTOLI, 2015). Lowery et al. (2009) detectaram a presença de miRNAs em 29 tumores mamários em estágio inicial, demonstrando o papel dessa molécula na progressão da doença. O desafio é deduzir a função desses miRNAs no ambiente tumoral (ANDORFER, 2011). Estudos sugerem uma ação conjunta das proteínas AGO2 e TNRC6A no silenciamento gênico por miRNAs no citoplasma. Quanto ao TNRC6A, sua expressão já foi descrita tanto no citoplasma quanto no núcleo. De fato, a proteína TNRC6A pode mover-se a partir do núcleo para o citoplasma para participar no processo de silenciamento, associando-se à proteína AGO 2 (KIM, 2010). No presente estudo, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *TNRC6A* a fim de descrever seu comportamento transcricional no CAM. Considerando as sequências desenhadas para o presente estudo, testes iniciais por PCR convencional revelaram a especificidade ao alvo (Figura 1). Essa especificidade é imprescindível para que outros genes não sejam erroneamente amplificados (PATEL, 2013).

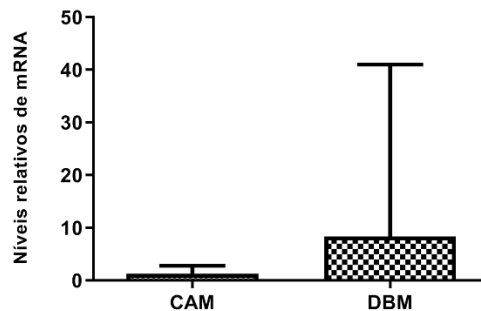
Figura 1: Amplificação do gene *TNRC6A* por PCR convencional. M- Marcador molecular de 100pb; 1 a 3: pacientes diagnosticadas com Câncer de Mama; 4 a 6: pacientes diagnosticadas com Doença Benigna da Mama; 7: controle negativo de reação



Posteriormente, foram realizadas as quantificações dos níveis relativos de mRNA das pacientes para o grupo CAM e DBM por qPCR (Figura 2). Observou-se que não houve diferença

estatisticamente significativa nos níveis de mRNA para o gene *TNRC6A* entre os grupos analisados. Também não foi verificada associação do marcador com dados clínico-patológicos como idade, grau, ER, PR e proliferação celular (ki67).

Figura 2: Quantificação relativa dos níveis transcricionais do gene *TNRC6A*. Os níveis relativos de mRNA foram comparados entre as amostras de Câncer de Mama e Doença Benigna da Mama.



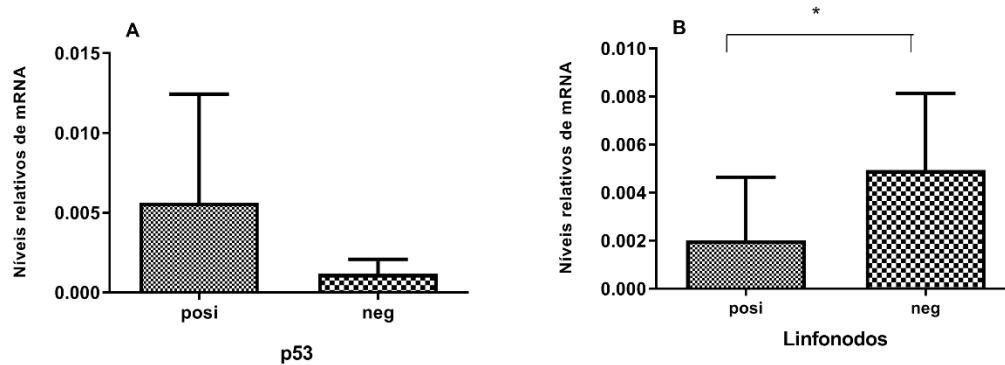
Yoo e colaboradores (2010), em ensaios de imunohistoquímica, verificaram a expressão de *TNRC6A* em células neoplásicas de esôfago e próstata. Como proteínas envolvidas na via de miRNA apresentam comportamentos distintos em diferentes patologias, não verificamos diferenças entre os transcritos do gene em amostras de CAM e DBM. Além disso, as funções desempenhadas pelo gene *TNRC6A* podem divergir conforme o tecido e sublocalização celular (NISHI, et al., 2015) e, portanto, a análise dos transcritos não seja suficiente para diferenciar tecidos normais de malignos.

Em um segundo momento analisamos apenas as amostras de pacientes com CAM (Figura 3). Verificou-se níveis elevados dos transcritos de *TNRC6A* em pacientes positivos para p53. O gene *P53* é um supressor de tumor típico e variações genéticas são comumente encontradas em células tumorais (ALSNER, 2000). Entre os fatores prognósticos analisados em estudos sobre CAM, a ausência de mutações do gene p53 prediz um maior sobrevida livre da doença e uma taxa de sobrevida global maior (YANG, 2013).

Por fim, foram detectados maiores níveis de transcritos do gene *TNRC6A* em pacientes que não apresentaram linfonodos comprometidos (Figura 5). O fator prognóstico mais importante no CAM em estágio inicial é o comprometimento axilar dos linfonodos (BARRY, 2018) e a detecção precoce do linfonodo metastático direciona a escolha de terapias adjuvantes. O status linfonodal é verificado por meio de uma biópsia seletiva do linfonodo sentinela (PURUSHOTHAM, 2005) e um biomarcador capaz de detectar esse estado metastático, correlacionando-se ao risco de propagação nodal axilar, é particularmente interessante na prática clínica (KARLIKOVA, 2016). Nosso gene, portanto, surge como uma proposta promissora, em que níveis mais baixos estariam relacionados

ao comprometimento dos linfonodos axilares e, portanto, a um possível risco de recidiva (WANG, 2014).

Figura 3: Quantificação relativa dos níveis transcricionais do gene *TNRC6A* em pacientes com Câncer de Mama. Estas foram agrupadas conforme a expressão de p53 (A) e comprometimento linfonodal (B). * $p < 0,05$. Posi: pacientes positivas; Neg: pacientes negativas.



Nossos resultados sugerem que alterações na maquinaria regulatória do mecanismo de miRNA podem ser selecionadas durante o desenvolvimento tumoral. Nesse contexto, há a perda da expressão do gene *TNRC6A* e o envolvimento de diferentes miRNAs na doença benigna e na evolução da doença maligna. Além disso, essa perda de expressão mostra-se crucial no prognóstico da paciente. Contudo, estudos adicionais são necessários para que seja relacionada a expressão diferencial do gene *TNRC6A* e os miRNAs envolvidos no CAM.

4 CONCLUSÃO

Com a análise dos níveis transcricionais, por qPCR, do gene *TNRC6A*, verificou-se que não houve uma diferença significativa entre o grupo CAM e DBM. Além disso, os dados de idade, grau, receptores hormonais e proliferação celular também não mostraram associação com o marcador. Interessantemente, menores níveis foram identificados em pacientes com comprometimento linfonodal, evidenciando a importância do gene *TNRC6A* na progressão de tumores mamários.

REFERÊNCIAS

- ANDORFER, C, A; NECELA, B, M; THOMPSON, E, A; PEREZ, E, A. **MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer.** *Trends in Molecular Medicine*, v. 17, n. 6, p. 313-9, 2011.
- ALSNER, J; YILMAZ, M; GULDBERG, P; HANSEN, L, L; OVERGAARD, J. **Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients.** *Clinical Cancer Research*, v.6, n. 10, p. 3923, 2000.
- ASHBY, J; FLACK, K; JIMENEZ, L, A; DUAN, Y; KHATIB, A, K; SOMLO, G; WANG, S, E; CUI, X; ZHONG, W. **Distribution profiling of circulating microRNAs**
- BARRY, P; VATSIO, A; SPITERI I; et al. **The Spatiotemporal Evolution of Lymph Node Spread in Early Breast Cancer.** *Clinical Cancer Research*. 2018
- BERTOLI, G; CAVA, C; CASTIGLIONI, I. **MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer.** *Theranostics*, v. 5, n. 10, p. 1122-1143, 2015.
- BOLAND, C, R; THIBODEAU, S, N; HAMILTON, S, R; SIDRANSKY, D; ESHLEMAN, J, R; BURT, R, W; MELTZER, S, J; RODRIGUEZ-BIGAS, M, A; FODDE, R; RANZANI, G, N; SRIVASTAVA, S. **A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer.** *Cancer Research*, v. 58, n. 22, p. 5248-57, 1998.
- DANKO, M; BENNETT, K; ZHAI, J; MARKS, J; OLSON, J. **Improved staging in node-positive breast cancer patients using lymph node ratio: results in 1,788 patients with long term follow-up.** *Journal of the American College of Surgeons*, v. 210, n. 5, p.795-805.
- DEN, H, P; SAVAGE, M, I; BROWN, P, H. **Targeted therapy for breast cancer prevention.** *Frontiers in oncology*. 2013.
- HANAHAHAN, D; WEINBER, R, A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v. 144, n.5, p. 646-74, 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Mama.** Disponível em:< <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 27 de maio 2020.
- KARLIKOVA, M; TOPOLCAN, O; NARSANSKA, A; KUCERA, RADEK; TRESKOVA, I; TRESKA, V. **Circulation Growth and Angiogenic Factors and Lymph Node Status in early-stage Breast Cancer- A pilot Study.** *Anticancer Research*, v. 36, p.4209-4214, 2016.
- KIM, M, S; OH, J, E; KIM, Y, R; PARK, S, W; KANG, M, R; KIM, S, S; AHN, C, H; YOO, N, J; LEE, S. H. **Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers.** *Journal of Pathology*, v, 221, n. 2, p. 139-46, 2010.

KUMAR, P; AGGARWAL R. **An Overview of triple- negative Breast Cancer.** *Archives of Gynecology and Obstetric*, v. 293 n. 2, p. 247- 269, 2016.

LI, J; ZHANG, Z; ROSENZWEIG, J; WANG, YY, CHAN, DW. **Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer.** *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 1296-304, 2002.

LOWERY, A, J; MILLER, N; DEVANEY, A; McNEIL, R, E; DAVOREN, P, A; LEMETRE, C; BENES, V; SCHMIDT, S; BLAKE, J; BALL, G; KERIN, M, J. **MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer.** *Breast Cancer Research*, 2009.

NERI, A; MARRELLI, D; ROVIELLO, F; de STEFANO, A; GUARNIERI, A; PALLUCA, E; PINTO, E. **Prognostic value of extracapsular extension of axillary lymph node metastases in T1 to T3 breast cancer.** *Annals of Surgical Oncology*, v. 12, n. 3, p. 246-53, 2005.

NISHI, K; TAKAHASHI, T; SUZAWA, M; MIYAKAWA, T. NAGASAWA, T. **Control of the localization and function of a miRNA silencing component TNRC6A by Argonaute protein.** *Nucleic Acids Research*, v.43, n.20, p.9856-73, 2015.

PATEL, N; PRAKASH, N. **Principles and tools for primer design.** *Biological Sciences*. 2013.

PURUSHOTHAM, A, D; UPPONI, S; KLEVESATH, M, B; BOBROW, L; MILLAR, K; MYLES, J, P; DUFFY, S, W. **Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: results from a randomized controlled trial.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 19, p:4312-21, 2005.

QU, H; XU, W; HUANG, Y; YANG, S. **Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.12, p.1117–1125, 2011.

REZAEIJAM, H; SHIRAZI, A; VALIZADEH, M; IZADI, P. **Candidate gene biosensors of mice and human exposure to ionizing radiation by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.** *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v.11, n.3, p.549-57, 2015.

SHEN, J; STASS, S, A; JIANG, F. **MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors.** *Cancer Letters*, v.329, p.125–136, 2013.

SHI, M; LIU, D; DUAN, H; SHEN, B; GUO, N. **Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis.** *Cancer Metastasis Reviews*, v.29, p.785–799, 2010.

TONELLOTO, F; BERGMANN, A; de SOUZA ABRAHÃO, K; de AGUIAR S, BELLO, M; THULER, L. **Impact of Number of Positive Lymph Nodes and Lymph Node Ratio on Survival of Women with Node- Positive Breast Cancer.** *European Journal of Breast Health*, v.15, n. 2, p. 76-84, 2019.

THOMPSON, A, M. **New standards of care in the management of the axilla.** *Current Opinion Oncology*, v.24, n.6, p.605–11, 2012.

WANG, B; LI, J; SUN, M; SUN, L; ZHANG, X. **miRNA expression in Breast Cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features.** *IUBMB LIFE*, v.66, n.5, p.371-7, 2014.

YANG, P; DU, C, W; KWAN, M; LIANG, S, X; ZHANG, G, J. **The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis.** *Science Reports*, 2013.

ZHENG, M; SUN, X; LI, Y; ZUO, W. **MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1.** *Tumour Biology*, v.37, p.8189–96, 2016.