

Análise global da expressão gênica diferencial no Câncer de mama Triplo Negativo

Global analysis of differential gene expression in Triple Negative Breast Cancer

Maria Clara Vasconcelos Berto¹
Kelly Cristina Rodrigues Simi²

RESUMO

O câncer de mama está entre as neoplasias que mais afetam mulheres no Brasil. Dentre os subtipos, destaca-se o Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC) com a maior malignidade, caracterizado pela ausência dos receptores de estrógeno, progesterona e do fator de crescimento epidérmico. Esse trabalho buscou elucidar, por meio de ferramentas computacionais e análises de dados genéticos, os principais genes diferencialmente expressos encontrados exclusivamente no subtipo TNBC, comparando-o com os demais e com tecidos de mama normais. Para isso, foi utilizada a plataforma de análise UALCAN, e GEPIA para validação das expressões genéticas. Dos 250 genes up-regulados, foram encontrados 92 exclusivos de TNBC, e dos 250 genes down-regulados, 53. Dentre esses, foram caracterizados como potenciais alvos terapêuticos e marcadores de prognóstico os genes IQGAP3, HJURP, FAM64a, TAT e HMGCS2, porém são necessários estudos mais aprofundados sobre as funções biológicas de cada um.

Palavras chave: Câncer de mama; genes diferencialmente expressos; bioinformática; TNBC; vias de sinalização.

ABSTRACT

Breast cancer is among the neoplasms that most affect women in Brazil. Among the subtypes, Triple Negative Breast Cancer (TNBC) stands out as the most malignant, characterized by the absence of estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptors. This work sought to elucidate, through computational tools and genetic data analysis, the main differentially expressed genes found exclusively in the TNBC subtype, comparing it with the others and with normal breast tissues. For this, the UALCAN analysis platform was used, and GEPIA was used to validate genetic expressions. Of the 250 up-regulated genes, 92 were found exclusive to TNBC, and of the 250 down-regulated genes, 53 were found. Among these, the genes IQGAP3, HJURP, FAM64a, TAT and HMGCS2 were characterized as potential therapeutic targets and prognostic markers, but they are necessary for further studies on the biological functions of each one.

Keywords: Breast cancer; differentially expressed genes; bioinformatics; TNBC; signaling pathways.

¹Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - CEUB

²Doutora em Biologia Molecular. Professora do Centro Universitário de Brasília - CEUB

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia que mais afeta mulheres no Brasil na atualidade, eliminando os tumores de pele não melanoma, sendo este classificado com base na sua etiologia caracterizada pela amplificação dos seguintes receptores hormonais: Receptor de Estrogênio (ER), Receptor de Progesterona (PR), Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (HER2) e Triplo Negativo, sendo o último definido pela ausência de ER, PR e HER2. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2022 foram estimados 66280 novos casos de câncer de mama no Brasil (BRASIL, 2022; KULASINGHE *et al.*, 2021).

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama estão a idade de gestação ou menopausa tardia devido a prolongada exposição a estrogênios; obesidade e alto consumo de gorduras por conta dos elevados níveis de quimiocinas inflamatórias. Entretanto, para o subtipo TNBC constatou-se que mulheres jovens, menores de 40 anos, são as mais afetadas devido a falta de rastreamento para câncer de mama nessa faixa etária. Além disso, esse dado foi relacionado aos hormônios presentes nessa fase da vida, bem como a maior exposição a carcinógenos a qual vem crescendo nessa idade (ORLANDINI *et al.*, 2021).

Essa neoplasia depende, além de fatores genéticos, da exposição humana a diferentes agentes que é denominada epigenética, sendo esta capaz de alterar as histonas, expressão de ácido ribonucleico (RNA) não codificante e mudar a metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA). As alterações celulares são provenientes de uma série de falhas no processo de reparo e replicação das células, pois há mutação de genes como Breast Cancer Gene (BRCA) 1 e 2, que são os responsáveis pelo reparo e verificação do ciclo celular, apoptose e regulação da transcrição. Por conta disso, esses genes são considerados supressores de tumor e suas modificações estão relacionadas a hábitos de vida, fatores genéticos e epigenéticos, o que impacta significativamente em um maior aumento dos casos nos últimos anos (CASAUBON *et al.*, 2022; SELMIN *et al.*, 2020).

Dentre os tipos de cânceres destacados, o Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC) é o mais agressivo e que possui um prognóstico desafiador, uma vez que o seu tratamento apresenta maiores dificuldades principalmente por não apresentar alvos moleculares, além de ser altamente invasivo e com taxas elevadas de metástase. Devido a sua heterogeneidade, são usadas quimioterapias inespecíficas mas por não obterem uma resposta completa há uma alta taxa de recorrência e consequente mortalidade (LI *et al.*, 2022).

O microambiente tumoral é caracterizado principalmente por apresentar linfócitos infiltrantes (TILs), que quando estão presentes em grandes quantidades podem indicar um bom prognóstico, assim como também estão presentes macrófagos (TAMs), neutrófilos (TANs), fibroblastos (CAFs), células Natural Killer (NK) e adipócitos. No entanto, no TNBC há uma maior taxa de infiltração de TILs e TAMs quando comparado com os outros tipos de câncer de mama, sendo o segundo um evento relacionado ao mau prognóstico uma vez que os macrófagos do tipo M2, que estão relacionados a invasão tumoral, apresentam-se em grande quantidade (FAN; HE, 2022).

Portanto, pesquisadores notaram que os diversos tipos de tumor de mama apresentam diferentes células recrutadas a depender de cada organismo. Dessa forma a bioinformática pode ser utilizada para comparar essas alterações tendo como referência o sequenciamento do genoma humano, sendo capaz de relacionar alguns mecanismos subjacentes que ainda não são amplamente esclarecidos. Além disso, por meio de

tecnologias é possível avaliar mutações pontuais no paciente e, com isso, utilizar um tratamento combinado mais específico (LEHMANN *et al.*, 2021).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, aumentou-se a quantidade de dados gerados, se tornando cada vez mais necessária a análise desses dados genéticos com intuito de ampliar os conhecimentos sobre as características moleculares dos diferentes microambientes dos subtipos de câncer de mama, bem como mapear suas principais diferenças. Dessa forma, para os subtipos mais agressivos, como é o caso do TNBC, essas informações permitem a descoberta de novos marcadores para diagnóstico, avaliação de prognóstico e monitoramento mais preciso para cada mutação ou alteração da composição tumoral, tendo em vista que pacientes com esse subtipo apresentam baixa taxa de sobrevida global (WU *et al.*, 2022).

Para essas novas descobertas, uma ferramenta útil é a análise dos Genes Diferencialmente Expressos (DEGs) tanto nesse subtipo de câncer como em outras patologias, podendo estes apresentarem-se aumentados (up-regulados) ou com expressão reduzida (down-regulados). Nesse contexto, uma das características que tornam as células diferentes é a sua alteração na expressão dos genes, sendo esta analisada através da quantificação de níveis de Ácido Ribonucleico mensageiro (RNAm) obtida por do sequenciamento de transcritos (RNA-Seq). Os DEGs correspondem a uma lista de genes gerada pela comparação da expressão gênica entre células semelhantes com intuito de compreender de forma biológica as alterações genéticas entre duas condições distintas, como tecidos saudáveis e doentes (RODRIGUEZ-ESTEBAN; JIANG, 2017).

Os dados de DEGs podem ser encontrados em bancos de dados públicos que apresentam não só a expressão dos genes, mas também características básicas sobre eles, como é o caso do *Gene Expression Omnibus* (GEO) e Atlas do Genoma Humano (TCGA). Entretanto, como se trata de um grande volume de dados, uma vez que o material genético apresenta muitas informações, torna-se necessário utilizar processadores robustos e ter habilidades computacionais. Com intuito de facilitar o acesso à esses bancos de dados, foram criadas plataformas de análises que utilizam ferramentas em linguagens de programação como *R* e *Python* para acessar dados pré processados, as quais têm como finalidade garantir interfaces de fácil acesso para o usuários como é o caso do UALCAN (Portal de análise de dados Câncer da Universidade de Alabama em Birmingham), GEPIA (Análise Interativa de Perfil de Expressão Gênica) e GEO2R (OLIVEIRA; RECH; SILVA, 2023).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise global da expressão gênica diferencial do câncer de mama TNBC para identificação de assinaturas genéticas utilizando banco de dados gratuitos.

2 METODOLOGIA

2.1 Verificação da expressão gênica e análise sobrevivência

Para a realização da busca pelos principais genes diferencialmente expressos foi utilizada uma plataforma online chamada UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/>). Essa ferramenta é um portal interativo de fácil acesso que permite o estudo das variações de expressão gênica, comparação de diferentes tumores, relacionando-os com as características clínicas e sobrevida dos pacientes. Para isso, a plataforma utiliza dados de Sequenciamento de RNA (RNA seq) de nível 3, ou seja, são dados pré-processados depositados no Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) tratados por meio de ambientes computacionais de

processamento de dados. Logo, permite que as análises de bioinformática sejam mais acessíveis, transparentes e simplificadas, uma vez que não é necessário desenvolver códigos ou utilizar linhas de comando para acesso e manuseio dos dados de sequenciamento (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2017).

A plataforma permite o download dos dados depositados que contem os valores de expressão gênica e a estimativa de transcrição geradas a partir do gene, além de informações dos pacientes como sexo, idade, grau do tumor, entre outros. Os gráficos para avaliação da expressão foram exibidos em formato de mapa de calor (*Heatmap*), enquanto dados de sobrevivência foram plotados por gráficos de Kaplan-Meier para cada gene de cada subtipo tumoral.

2.2 Seleção dos dados

Para a obtenção desses dados foram selecionados os cânceres de mama do tipo HER2+, TNBC e Luminal (ER+, PR+ e HER2+/-). Posterior a isso foi possível navegar pelas características de cada gene diferentemente expressos descritas no UALCAN, onde o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, gerando um arquivo formato .csv para filtragem dos dados com os 250 genes diferencialmente expressos tanto up quanto down-regulados, quando comparados com tecido saudável. Além disso, também foram informados os genes de interesse, sendo a plataforma capaz de fornecer dados como expressão *pan-cancer* (no formato de diagrama de caixa - *boxplot*) dos genes possivelmente correlatos e outros links que direcionam a bancos de dados os quais possuem informações complementares.

2.3 Construção do Diagrama de Venn

Os diagramas de Venn foram gerados por meio da plataforma *Interactive Venn* (<http://www.interactivenn.net/>) desenvolvida por Herbele *et al.* (2015) utilizando os conjuntos de dados dos Genes Diferencialmente Expressos (DEGs) obtidos pelo UALCAN. Para melhor organização, foi feita uma entrada apenas com os genes up-regulados e outra com os down-regulados, a fim de encontrar a interseção entre eles.

2.4 Identificação de vias de sinalização

Com intuito de compreender as vias de ação dos genes up e down-regulados compartilhados entre os três tipos de câncer, foi utilizado o Reactome (<https://reactome.org/>), uma base de conhecimento que fornece informações sobre processos fisiológicos e biológicos para visualizar vias enriquecidas com base nos genes de interesse que foram fornecidos. A entrada de dados utilizados para cada subgrupo foi os 250 genes obtidos pela plataforma UALCAN.

2.5 Validação dos genes

Com intuito de validar a expressão de genes apresentada pela plataforma UALCAN, foi utilizado o GEPIA (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>), um servidor web capaz de analisar expressão de genes de diversos tumores através da comparação com tecidos

normais, através de dados depositados no banco de dados do TCGA e GTEx (Projeto Genotype-Tissue Expression).

2.6 Detecção dos genes por imunohistoquímica

A plataforma *The Human Protein Atlas* (THPA) disponível em <https://www.proteinatlas.org/> foi utilizada para verificar se as proteínas codificadas pelos genes mais promissores são possíveis de detecção pela técnica de imunohistoquímica.

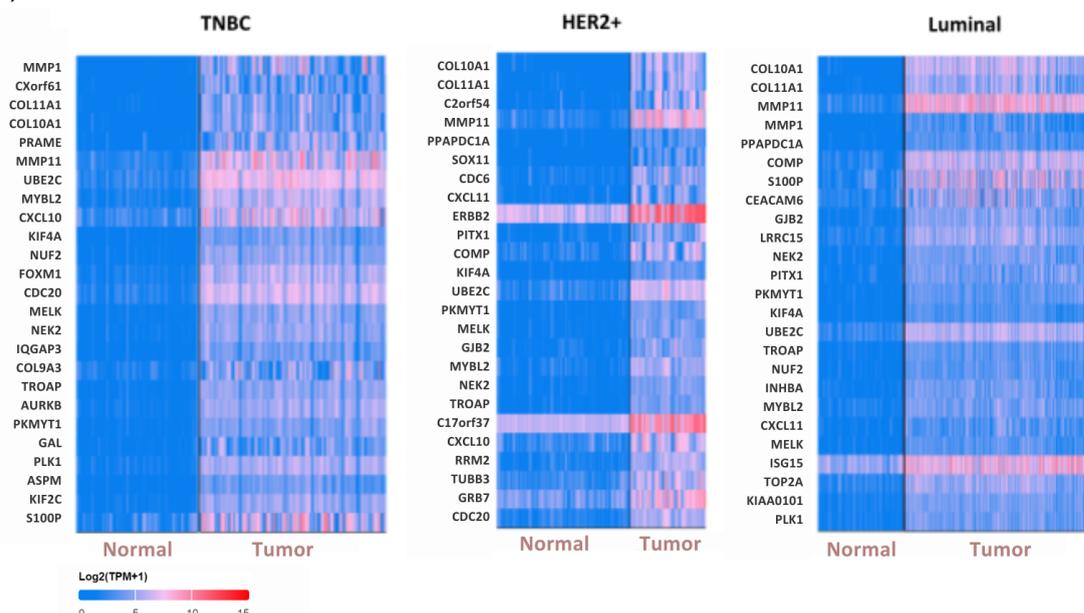
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Visão global dos genes diferencialmente expressos em TNBC

Um gene é classificado como diferencialmente expresso quando, a partir da comparação entre duas condições experimentais distintas de uma célula, é percebida uma diferença de nível de expressão ou contagem de leitura significativa. Portanto, o estudo dessa diferença é importante para entender a discordância biológica entre saudáveis e doentes, ou entre duas condições de doentes distintos, como é o caso das comparações entre subtipos de um mesmo câncer. Entretanto, torna-se imprescindível salientar que nem todas as alterações de expressão apresentam significado clínico, sendo necessária a investigação dessa mudança (ANJUM *et al.*, 2016).

Para a investigação desses DEGs, foram utilizadas tecnologias computacionais, sendo estas as ferramentas UALCAN e Interactive Venn para fornecimento e tratamento dos dados analisados. A primeira, por ser um banco de dados interativo, encontrou e apresentou, por meio de um gráfico de calor e tabela no excel os 250 genes up-regulados e os 250 genes down-regulados dos cânceres de mama HER2+, TNBC e Luminal, sendo o último caracterizado pela positividade dos receptores ER. Os 25 primeiros genes dessa lista estão destacados na figura 1.

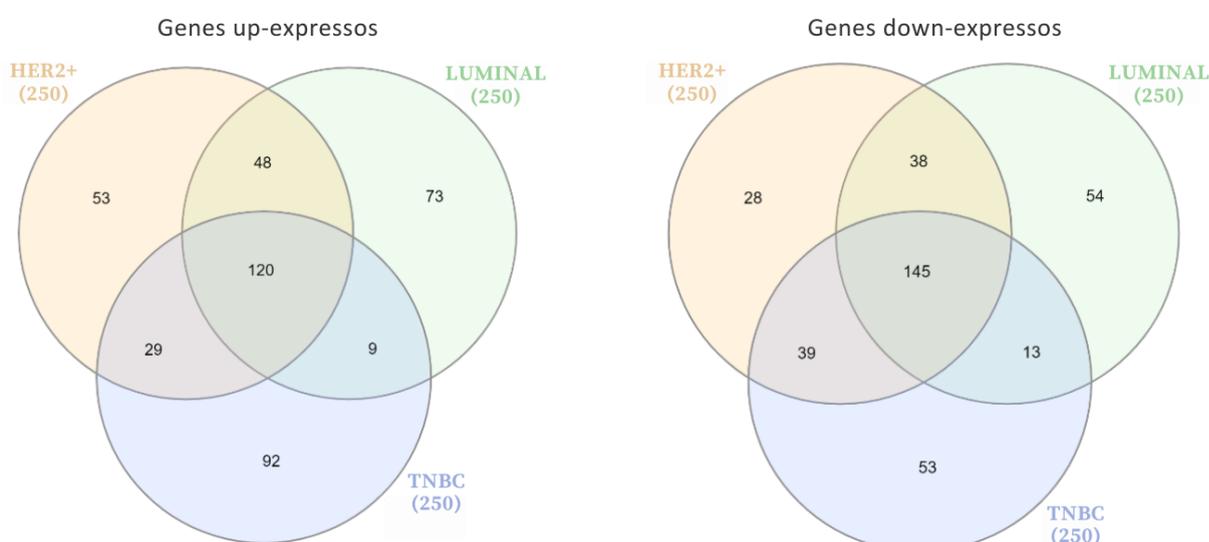
Figura 1: Expressão diferencial dos 25 principais genes up-regulados do câncer de mama TNBC, HER2+ e Luminal.



Legenda: Representação de *heatmap* obtida por análise na plataforma UALCAN dos primeiros 25 genes diferencialmente up-expressos em câncer de mama TNBC (MMP1, CXorf61, COL11A1, COL10A1, PRAME, MMP11, UBE2C, MYBL2, CXCL10, KIF4A, NUF2, FOXM1, CDC20, MELK, NEK2, IQGAP3, COL9A3, TROAP, AURKB, PKMYT1, GAL, PLK1, ASPM, KIF2C, S100P), HER2+ (COL10A1, COL11A1, C2orf54, MMP11, PPAPDC1A, SOX11, CDC6, CXCL11, ERBB2, PITX1, COMP, KIF4A, UBE2C, PKMYT1, MELK, GJB2, MYBL2, NEK2, TROAP, C17orf37, CXCL10, RRM2, TUBB3, GRB7, CDC20) e Luminal (COL10A1, COL11A1, MMP11, MMP1, PPAPDC1A, COMP, S100P, CEACAM6, GJB2, LRRC15, NEK2, PITX1, PKMYT1, KIF4A, UBE2C, TROAP, NUF2, INHBA, MYBL2, CXCL11, MELK, ISG15, TOP2A, KIAA0101, PLK1).

Complementar a isso, a segunda ferramenta foi utilizada para que, com base na tabela de DEGs do UALCAN, fosse possível encontrar quais desses genes estavam super regulados em apenas um dos cânceres e, caso não atendessem a essa condição, estariam compartilhados entre os subtipos conforme mostrado na figura 2.

Figura 2: Correlação dos 250 genes up e down regulados do câncer de mama TNBC, HER2+ e Luminal.



Legenda: A figura 2 foi obtida pela ferramenta Interactive Venn, através do compilado dos dados de expressão obtidos pelo UALCAN, demonstrando assim um Diagrama de Venn com intersecção dos 250 genes up-expressos ou down-expressos nos três subtipos de câncer.

Essa primeira etapa da análise teve como objetivo caracterizar a expressão gênica global dos três subtipos de câncer de mama. Por meio do Diagrama de Venn (figura 2) foi possível verificar que, dos 250 genes up-regulados em TNBC, 92 são exclusivos, 9 faziam intersecção apenas com o subtipo Luminal e 29 faziam intersecção apenas com o subtipo HER2+. A maioria dos genes, um total de 120, fazem intersecção com os três subtipos de câncer de mama.

Em contrapartida, ao avaliar os genes down-regulados, verificou-se que, dos 250 genes analisados, 53 eram exclusivos em TNBC, 13 faziam intersecção com o Luminal e 39, com subtipo HER2+. Além disso, foi encontrada uma intersecção de 145 genes entre os três subtipos. Com isso, foi possível verificar que nem todos os genes são exclusivos de um subtipo ou uma condição, visto que devido a mesma origem estes compartilham algumas vias de sinalização.

3.2 Envolvimento em processos biológicos dos genes up ou down-regulados de TNBC

As vias de sinalização dos genes são as principais fontes de estudo para entender as desordens fisiológicas causadas por diversas patologias, uma vez que elas são malélicas aos organismos mas buscam aproveitar, de forma silenciosa, os mecanismos normais usados pelas células para garantirem sua sobrevivência. Com isso, esse mecanismo traduz os sinais extracelulares por meio das interações ligante-receptor que acontecem na superfície celular levando as respostas celulares como proliferação, diferenciação, ativação do metabolismo e morte. Portanto, ao compreender as vias críticas relacionadas aos genes ativados no câncer de mama é possível projetar estratégias de regeneração do tecido (KABIR *et al.*, 2018).

Para que isso seja possível, ocorre uma retransmissão dos sinais gerados fora da célula para dentro, regulando assim a expressão gênica intracelular. Diversos estudos mostraram que os tumores surgem de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor, tornando capaz a regulação e expressão de enzimas. No entanto, não apenas mutações mas também a quantidade na expressão do gene é capaz de desviar as vias naturais de ação desses genes, o que permite também a plasticidade metabólica e adaptação ao ambiente de crescimento celular (PARK; PYUN; PARK, 2020).

Quanto à regulação da expressão gênica, segundo Vishnubalaji e Alajez (2021), ela envolve ativação de diversos fatores de transcrição e vias de sinalização e, com isso, os genes up-regulados apresentam sua expressão e função aumentada. Para avaliar em quais processos biológicos os 250 genes (up e down) selecionados estavam envolvidos, foi realizada análise dentro do Reactome (Figura 3A). Através de um gráfico de enriquecimento de vias gerado pelo Reactome, onde os locais destacados em amarelo representam as vias relacionadas aos genes usados como entrada. Dentre elas, destaca-se a degradação da matriz extracelular, principalmente colágeno, onde segundo Mah *et al.* (2018), essa condição favorece que células cancerígenas escapem do sistema imunológico, por impactarem a via de sinalização da integrina.

Outra via envolvida é a de degranulação de neutrófilos, estando enriquecida em pacientes triplo negativos, sendo um marcador de mau prognóstico, porém, de acordo com Zheng *et al.* (2023), há necessidade de ser melhor avaliado quanto ao subtipo dessa célula imune envolvida no microambiente descrito. Por fim, foi encontrada relacionada aos 250 up-regulados a via de apresentação de antígeno de MHC de classe II, estando relacionada a um bom prognóstico, uma vez que as células tumorais apresentam antígenos específicos do tumor aos linfócitos T CD4+, induzindo assim o recrutamento dos TILs (FORERO *et al.*, 2016).

Em contrapartida, a figura 3B demonstrou os 250 down-expressos em TNBC, sendo as suas vias de sinalização relacionadas ao sistema neuronal e transdução de sinal como: metabolismo da serotonina, biossíntese do ácido retinóico e glicólise, onde juntas em baixa regulação podem desfavorecer o crescimento cancerígeno, uma vez que, segundo Sola-Penna *et al.* (2020), essas apresentam tendência de consumir alta quantidade de glicose. Além dessas vias, estão envolvidas também vias de reprogramação metabólica e modificação pós traducional das proteínas, em especial a fosforilação, as quais podem estar relacionadas com o desenvolvimento e progressão das células tumorais (LIU *et al.*, 2022)

3.3 Genes diferencialmente expressos exclusivamente em TNBC

3.3.1 Genes up-regulados

Dentre os 92 genes exclusivos em TNBC, foram selecionados os 10 mais up-regulados em ordem decrescente de *Fold Change*, medida gerada pelo próprio UALCAN que define quantas vezes mais o gene é expresso em relação ao normal. Todos os genes selecionados possuíam valor de significância estatística (*p-value*) menor que 0,05, quando comparado a expressão gênica de tecido normal *versus* tumor. Esses genes estão descritos na tabela abaixo, com seus respectivos *p-value*.

Tabela 1: Descrição dos 10 principais genes up-regulados exclusivamente em TNBC, listados em ordem decrescente de *Fold Change* predefinida pela plataforma UALCAN.

Gene	Descrição	<i>p-value</i>
IQGAP3	Participa da transdução de sinal dentro das células; auxilia na proliferação de células mamárias, regulando a organização feita pelo esqueleto de actina e acelerando o processo; capaz de se ligar a proteínas Ras e interromper o ciclo celular e o reparo do DNA, aumentando a chance de mutações (HUA <i>et al.</i> , 2021).	1,62e-12
COL9A3	Codifica uma cadeia alfa do colágeno tipo IX, participando da adesão celular à matriz cartilaginosa (LV <i>et al.</i> , 2019).	7,25e-09
ASPM	Proteína de fuso mitótico, sendo reguladora da via entre HERC2 (ligase de proteína ubiquitina gigante E3 - reparo do DNA) e BRCA1, capaz de garantir estabilidade ao BRCA1 (XU <i>et al.</i> , 2021).	<1e-12
EXO1	Proteína que tem função de exonuclease 5' - 3' (cliva nucleotídeos a partir do final da cadeia polinucleotídica); pode também ter função de reparo (exonuclease 3' - 5') de incompatibilidade do DNA, bem como recombinação do DNA; regulação do caminho de transcrição gênica e expressão dos genes (LIU; ZHANG, 2021). Sua expressão aumentada gera alta taxa de recombinação, ativação da via Ras/Pi3K que promove crescimento e sobrevivência celular (SHI <i>et al.</i> , 2022).	<1e-12
HJURP	Participa da formação e regulação do centrômero recentemente replicados, além de estar envolvido na regulação mitótica (MAO <i>et al.</i> , 2022).	<1e-12
CDCA2	Proteína relacionada ao ciclo celular, na fase de anáfase, além de estar envolvido na resposta a danos no DNA; capaz de proporcionar a proliferação de células	<1e-12

	cancerígenas (TANG <i>et al.</i> , 2022).	
FAM64A	Envolvido na divisão celular (metáfase/anáfase), atuando como potencial marcador para proliferação e tumorigênese; ativa a via de sinalização NF-κB (fator de transcrição envolvido em resposta celular (ZHAO <i>et al.</i> , 2023).	1,62e-12
TTK	Proteína relacionada ao dano no DNA e ciclo celular, sendo necessária na mitose (para alinhamento dos cromossomos no centrômero) e duplicação do centrossomo. Se desregulada, não é degradada, produzindo centrossoma em excesso. Participa da invasão celular e sinalização de TGF-β (KING <i>et al.</i> , 2018).	<1e-12
CCNE1	Funciona como uma subunidade que regula a quinase CDK2 (atua na transição G1/S do ciclo celular), sendo degradada à medida que o ciclo passa pela fase S. Sua superexpressão resulta em uma instabilidade cromossômica devido a replicação constante do DNA (ZHAO <i>et al.</i> , 2019).	1,62e-12
RAD54L	Proteína envolvida no reparo do DNA (quebra da dupla fita) e recombinação homóloga, facilitando o emparelhamento com o DNA homólogo e estimulando a recombinação (ALMALKI <i>et al.</i> , 2023).	1,62e-12

3.3.2 Genes down-regulados

Dentre os 53 genes exclusivos em TNBC, também foram selecionados os 10 mais down-regulados em ordem decrescente de *Fold Change*, medida gerada pelo próprio UALCAN que define quantas vezes menos o gene é expresso em relação ao normal. Todos os genes selecionados possuíam valor de significância estatística (*p-value*) menor que 0,05, quando comparado a expressão gênica de tecido normal *versus* tumor. Esses genes estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2: Descrição dos 10 principais genes Down-regulados exclusivamente em TNBC, em ordem decrescente de *Fold Change* predefinida pela plataforma UALCAN.

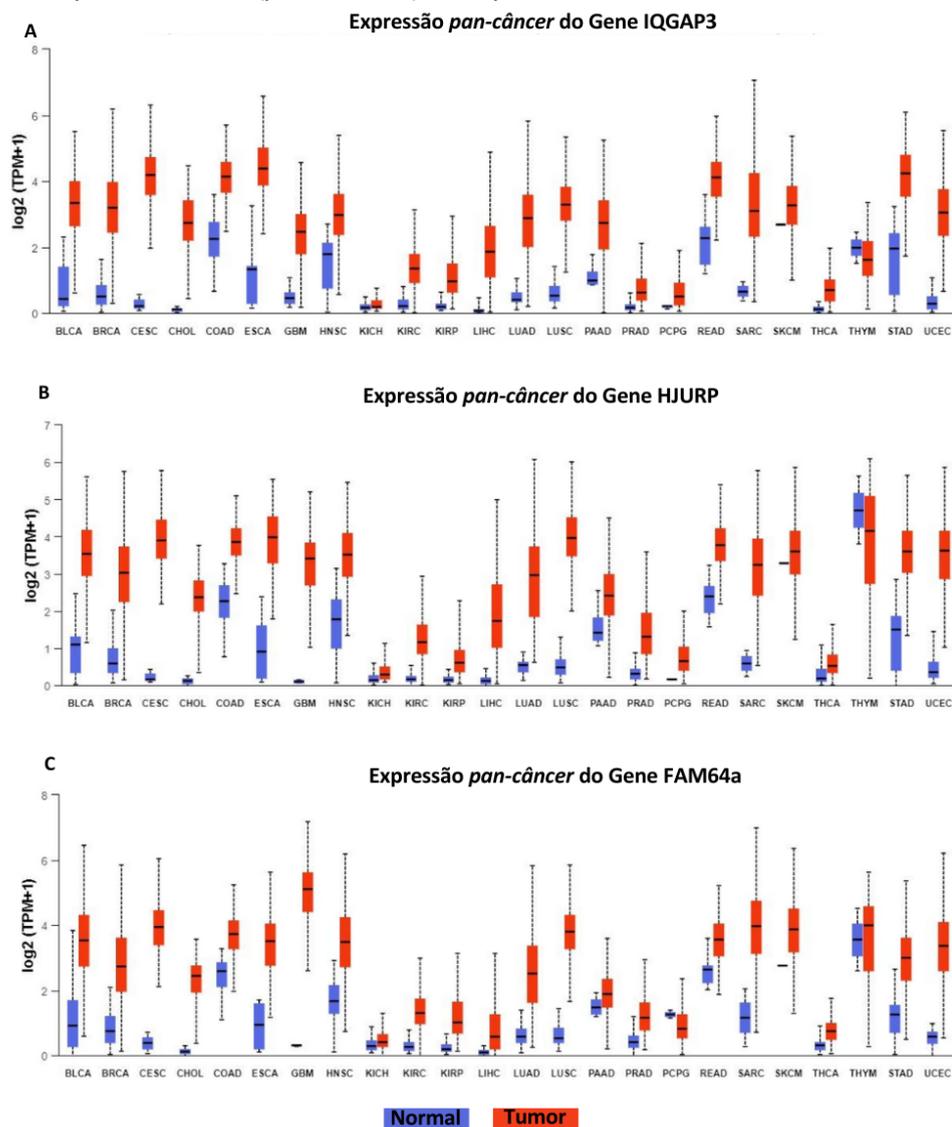
Gene	Descrição	p-value
TAT	Codifica a proteína tirosina aminotransferase; enzima mitocondrial presente no fígado participa do metabolismo da tirosina e tem efeito pró-apoptótico; um gene regulador de TAT está presente no cromossomo X (ANSAR et al., 2019).	1,76e-03
ADCY5	Proteína capaz de catalisar a formação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) - participa da transdução do sinal; controle do metabolismo celular, sua expressão pode ser regulada por um gene supressor do tumor (FOXP1) (REBBECK et al., 2019).	1,62e-12
ABLIM3	Proteína de ligação a actina, participa da organização do citoesqueleto e migração das células (WU et al., 2020).	<1e-12
HMGCS2	Enzima que participa da cetogênese (metabolismo de lipídeos); atua na via de sinalização PPAR (regulação da transcrição gênica); pode atuar como um gene supressor de tumor (WANG et.al., 2019).	1,62e-02
GPR81	Participa da transdução de sinal através da proteína G; proteínas codificadas por esse gene captam lactato para ser utilizado como fonte alternativa de energia para células cancerígenas; Altos níveis de lactato promovem seu feedback negativo (NAIK; DECOCK, 2020).	1,65e-12
MGLL	Participa da conversão de monoacilglicerídeos em ácido graxo e glicerol, bem como da biossíntese de glicerofosfolipídeos; presente em vias relacionadas e nocicepção e dor (BENCHAMA et al., 2022).	1,62e-12
C16orf89	Relacionado ao metabolismo da tireoide (GENECARDS, 2023).	4,05e-14
SLC7A2	Enzima que transporta aminoácidos catiônicos (ornitina, lisina e arginina) através da membrana plasmática; atividade anti-inflamatória (XIA et al., 2021).	3,33e-16
RAPGEF3	Relacionado a vias de integração do metabolismo energético e a sinalização da integrina; regula a organização do esqueleto de actina; participa do processo de ativação e modificação de proteínas; Sua proteína	<1e-12

	codificada, EPAC1, é secretada e atua na migração celular e metástase (KUMAR et al., 2018).	
SLIT3	Proteína secretada; participa da migração celular, orientação de axônios no cérebro e supressão do crescimento tumoral (JABBARI et al., 2022).	<1e-12

3.4 Proposição de genes candidatos

De acordo com as análises estatísticas e bibliográficas realizadas dos principais genes up e down-regulados, os genes IQGAP3, HJURP, FAM64a, TAT e HMGCS2 apresentaram-se promissores como possíveis alvos terapêuticos e como marcadores para diagnóstico e prognóstico de câncer de mama TNBC. Esses poderiam ser utilizados como painel de evolução do microambiente tumoral de pacientes com TNBC.

Figura 4: Diagrama de caixa (*boxplot*) dos genes IQGAP3, HJURP e FAM64a diferenciando a expressão em tipos de tumor (*pan-câncer*), comparando cada um com seus tecidos normais.



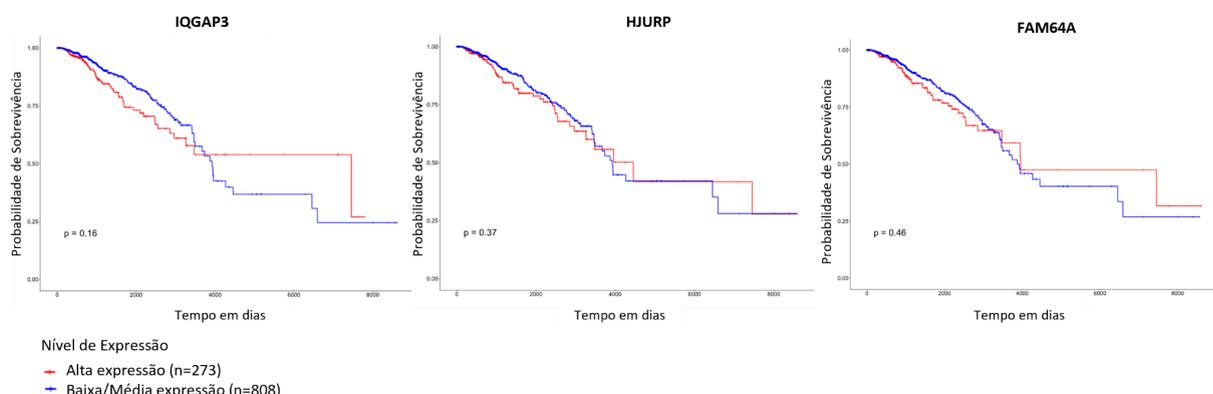
Legenda: Análise de expressão *pan-câncer* gerada através da plataforma UALCAN. BRCA leva em consideração dados de câncer Luminal, HER2+ e TNBC, podendo não representar apenas um subtipo conforme descrito em análise de amostras isoladas por subgrupos (adenocarcinoma de cólon (COAD), adenocarcinoma de pulmão (LUAD), carcinoma de células escamosas de pulmão (LUSC), adenocarcinoma retal (READ), cromóforo renal (KICH), rim renal carcinoma de células claras (KIRC), carcinoma de células papilares renais renais (KIRP), carcinoma urotelial de bexiga (BLCA), carcinoma invasivo de mama (BRCA), adenocarcinoma de próstata (PRAD), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC), carcinoma de esôfago (ESCA), carcinoma hepatocelular do fígado (LIHC), carcinoma endometrial do corpo uterino (UCEC) e carcinoma da tireoide (THCA)).

Com intuito de verificar se a expressão desses genes são encontrados em outros tipos de câncer, foi realizada uma análise *pan-câncer*, a qual se caracteriza por fazer uma avaliação desses componentes em diversos tumores, como mostra as figuras 4 e 6. Segundo Aaltonen *et al.*, 2020, esse tipo de análise permite apresentar as características comuns entre os diferentes tipos de neoplasias humanas por meio das diversas técnicas de sequenciamento aplicadas a diferentes tecidos, com intuito de gerar uma interseção entre os diferentes tecidos cancerígenos.

O gene IQGAP3 apresentou-se superexpresso em diversos subtipos de câncer e tem menor expressão em tecidos normais, como mostra a figura 4A. No entanto, quando avaliado o gráfico de Kaplan-Meier (Figura 5), o qual traz correlações de sobrevida e expressão gênica dentro do BRCA, percebe-se que pacientes com menor expressão apresentam pior sobrevida, porém caso seja observada uma queda na superexpressão após um período, isso pode indicar piora no prognóstico do paciente.

Segundo HUA *et al.* (2021), essa superexpressão pode indicar resistência à quimioterapia, trazendo maiores índices de reincidência, além de acelerar a proliferação e invasão celular, apresentando potencial de ser detectado no sangue por ser uma proteína secretada. Ademais, a proteína codificada por esse gene pode ser detectada por testes de imunohistoquímica, como demonstrado nas análises dentro da plataforma THPA (Figura 8A). Portanto, conclui-se que esse pode ser utilizado como marcador de rastreamento que poderia indicar a necessidade de tratamento mais agressivo, devido a possibilidade de resistência. Contudo, são necessários estudos clínicos que confirmem tais achados.

Figura 5: Efeito do nível de expressão gênica na sobrevivência de pacientes com BRCA dos genes IQGAP3, HJURP e FAM64a.

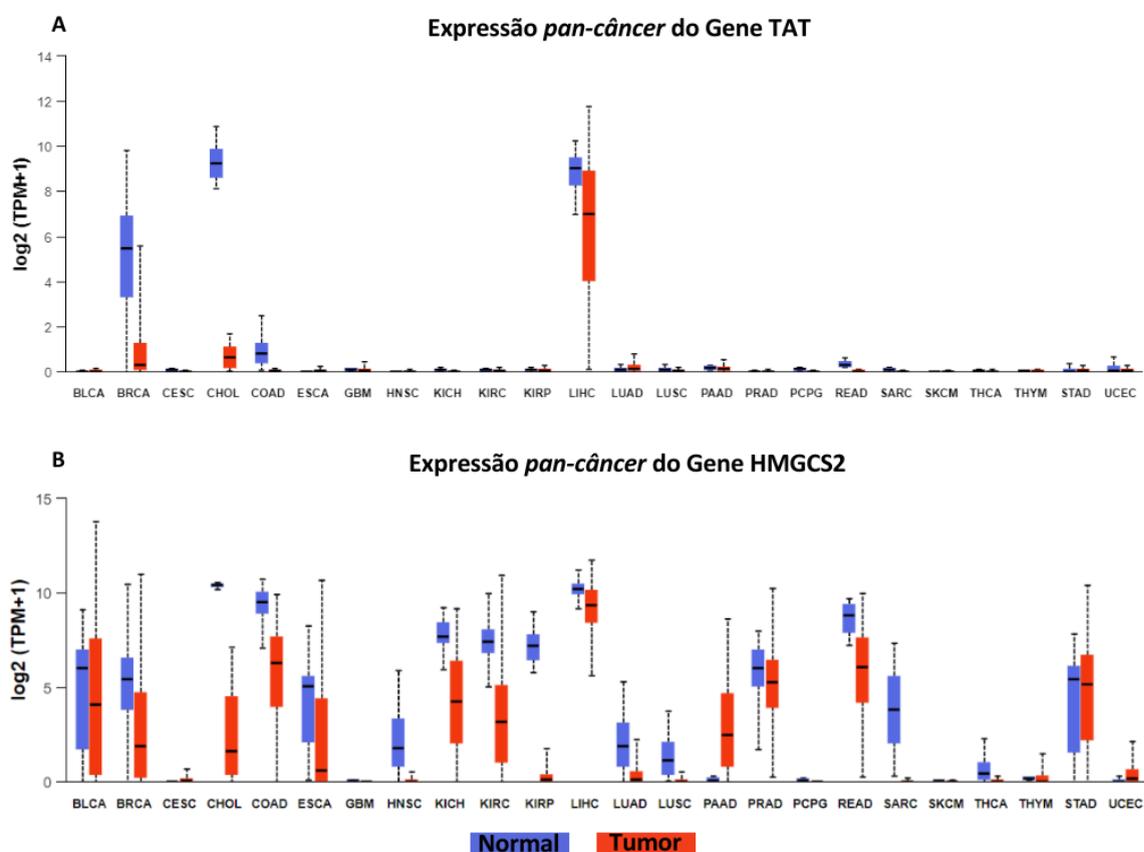


Legenda: Análise de sobrevivência com base no nível de expressão gênica em pacientes com BRCA avaliados por gráficos de Kaplan Meier disponíveis na plataforma UALCAN.

Com relação ao gene HJURP, sua expressão em tecidos normais e tumorais apresenta uma discrepância significativa, como é possível observar na figura 4B. No entanto, a sobrevida de pacientes com down e up regulação não apresenta grande diferença, como é possível avaliar na figura 5. Apesar disso, Segundo LI *et al.* (2023), pacientes com alta expressão desse gene apresentam melhor resposta à radioterapia, porém com maior risco de recorrência, sendo assim um possível marcador de evolução do câncer. Com isso, de acordo com o THPA, o produto desse gene pode ser também detectado no tecido tumoral, como demonstrado na figura 8B, podendo, assim, confirmar a sua contribuição como possível marcador.

Por fim, dentre os genes superexpressos considerados potenciais marcadores no prognóstico e evolução dos pacientes com BRCA, destaca-se também o gene FAM64a, o qual de acordo com a figura 4C apresenta baixa expressão em diversos tecidos normais, em contraste com alta expressão em tecidos tumorais. Além disso, com relação à sobrevivência e expressão desse gene, foi possível observar, conforme apresentado na figura 5, que não há uma discrepância significativa entre a sobrevivência de pacientes com up e down regulação. De acordo com Zhao *et al.* (2023), esse gene pode ser utilizado como marcador de alta proliferação celular e, por ser capaz de ativar a via de sinalização NF-kB, a qual é capaz de regular fatores anti-apoptóticos, promove maior agressividade ao câncer de mama. Portanto, esse é um potencial marcador da evolução do TNBC, podendo a proteína ser detectada por imunohistoquímica, como mostra a figura 8C, principalmente em estágios avançados, onde de acordo com o gráfico de Kaplan-Meier, pode haver uma pequena queda na sobrevida.

Figura 6: Análise dos genes TAT E HMGCS2 diferenciando a expressão em diferentes tipos de tumor (*pan-câncer*), comparando cada um com seus tecidos normais.

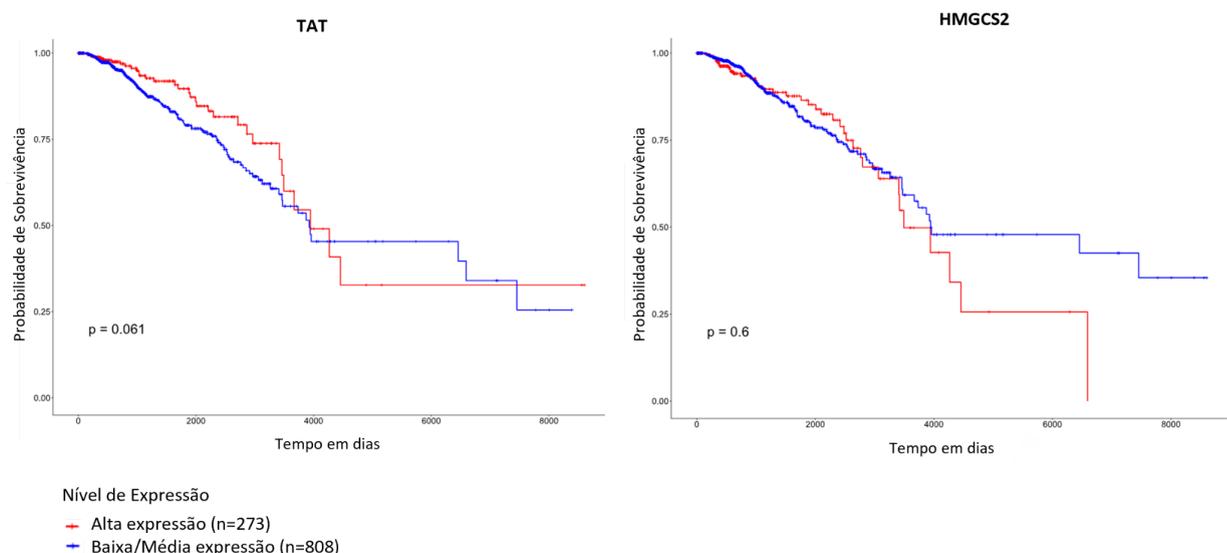


Legenda: Análise de expressão *pan-câncer* gerada através da plataforma UALCAN. BRCA leva em consideração dados de câncer Luminal, HER2+ e TNBC, podendo não representar apenas um subtipo conforme descrito em análise de amostras isoladas por subgrupos (adenocarcinoma de cólon (COAD), adenocarcinoma de pulmão (LUAD), carcinoma de células escamosas de pulmão (LUSC), adenocarcinoma retal (READ), cromóforo renal (KICH), rim renal carcinoma de células claras (KIRC), carcinoma de células papilares renais renais (KIRP), carcinoma urotelial de bexiga (BLCA), carcinoma invasivo de mama (BRCA), adenocarcinoma de próstata (PRAD), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC), carcinoma de esôfago (ESCA), carcinoma hepatocelular do fígado (LIHC), carcinoma endometrial do corpo uterino (UCEC) e carcinoma da tireoide (THCA)).

Outro gene que deve ser avaliado é o TAT, o qual de acordo com a figura 6A é expresso significativamente apenas no tumor de hepatocarcinoma celular, apresentando baixa expressão em BRCA, especificamente TNBC, quando comparada com tecido de mama normal. No entanto, encontra-se superexpresso apenas em tecidos saudáveis de mama e fígado, porém, como apresentado na figura 7, a sua baixa expressão não tem relação direta com a sobrevida da paciente. Sendo assim, é importante o estudo aprofundado neste gene, sendo potencialmente usado como biomarcador e um gene de supressão tumoral, uma vez que segundo Ansar *et al.* (2019) foi relatada sua deleção em outros tumores, como de fígado, em pacientes com pior prognóstico.

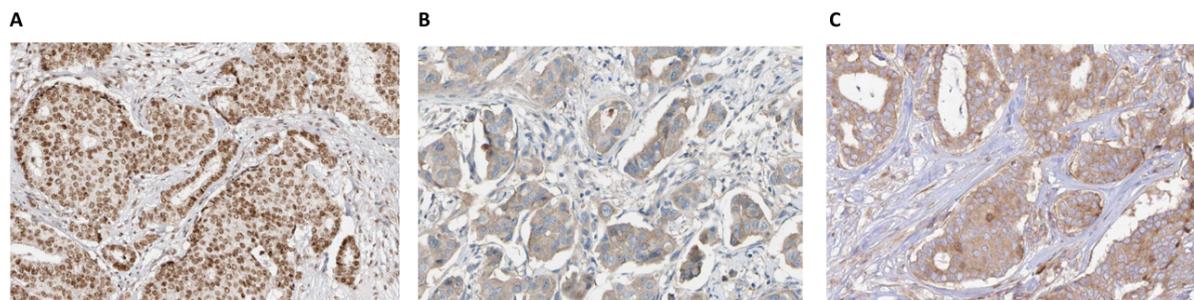
Ademais, o gene HMGCS2 pode ser um potencial marcador a ser explorado, haja vista conforme a figura 6B, é um gene que encontra-se mais expresso em tecidos de mama normais quando comparado com BRCA. Além disso, como mostra na figura 7, a sua baixa expressão pode ser um fator que demonstra bom prognóstico, pois caso seja encontrado em alta expressão pode indicar uma baixa chance de sobrevivência. Contudo, de acordo com o Atlas de Proteína Humano, a proteína codificada por esse gene pode ser identificada em células glandulares do tecido mamário com uso de alguns anticorpos específicos, sendo assim um importante alvo para análise de prognóstico através de técnicas de imunohistoquímica, uma vez que sua ausência na detecção em pacientes TNBC pode indicar bom prognóstico (GROMOV *et al.*, 2014).

Figura 7: Efeito do nível de expressão gênica na sobrevivência de pacientes com BRCA.



Legenda: Análise de sobrevivência com base no nível de expressão gênica em pacientes com BRCA avaliados por gráficos de Kaplan Meier disponíveis na plataforma UALCAN.

Figura 8: Imuno-histoquímica dos genes IQGAP3, HJURP e FAM64a.



Legenda: Análise de marcação dos genes em BRCA por imuno-histoquímica obtidas pela plataforma Atlas de Proteínas Humanas (THPA), onde regiões com coloração marrom determinam a detecção do produto gênico. Em A, IQGAP3; em B, HJURP; e em C, FAM64a.

Vale ressaltar que os dados de expressão foram validados com a plataforma GEPIA, sendo considerado up-regulado os genes com parâmetro *Fold Change* maior que 1, enquanto os down regulados apresentaram *Fold Change* menor que 1. Entretanto, alguns achados não corroboram totalmente com a literatura principalmente por se tratar, em sua maioria, de dados *in vitro*, sendo necessários estudos mais aprofundados desses genes, com intuito de concluir sobre up e down-expressão, uma vez que por se tratar de um câncer altamente heterogêneo, torna-se desafiador encontrar um padrão de expressão para esse microambiente.

4 CONCLUSÃO

Os estudos relacionados a descrição do microambiente tumoral do câncer de mama, especificamente o subtipo triplo negativo, vem crescendo nos últimos anos, tanto por conta do aumento dos casos positivos, como também pelo acompanhamento do desenvolvimento de tecnologias mais precisas que permitiram diversas descobertas. Dessa forma, notou-se que além de fatores genéticos, há outras variáveis relacionadas a essa neoplasia, como estilo de vida, fatores ambientais e epigenéticos.

Aplicando os métodos de comparação, correlação e interseção de dados, busca de evidências em bibliografias e análises de expressão gênica, concluímos que existem outros genes pouco explorados na literatura que podem ser usados como potenciais alvos terapêutico e possíveis marcadores prognósticos e evolução em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo. Dentre esses, podemos citar os genes IQGAP3, HJURP e FAM64a encontrados superexpressos em TNBC, os quais seus produtos gênicos podem ser detectados por técnicas de imuno-histoquímica, bem como os genes TAT e HMGCS2, os quais apresentaram expressão reduzida nesse subtipo de BRCA.

No entanto, são necessários novos ensaios clínicos e estudos para busca de evidência sobre o padrão de expressão desses genes e as inconsistências encontradas na literatura, bem como elucidar as principais vias de sinalização que esses genes estão envolvidos no microambiente do TNBC, com intuito de prever os principais benefícios de seus usos na prática clínica. Além disso, é importante esclarecer como os tumores realizam a reprogramação metabólica e o escape imunológico através de mecanismos ainda desconhecidos.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L. A. *et al.* Pan-cancer analysis of whole genomes. **Nature**, n. 578, p. 82–93, fev. 2020.
- ALMALKI, E. *et al.*. The Curcumin Analog PAC Is a Potential Solution for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer by Modulating the Gene Expression of DNA Repair Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, jun. 2023.
- ANJUM, A. *et al.* Identification of Differentially Expressed Genes in RNA-seq Data of *Arabidopsis thaliana*: A Compound Distribution Approach. **Journal of Computational Biology**, v. 23, n. 4, p. 239, apr. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4827276/>. Acesso em: 12 set. 2023.
- ANSAR, E. S. *et al.* Significant random signatures reveals new biomarker for breast cancer. **BMC Medical Genomics**, v. 12, n. 1, 2019. Disponível em: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-019-0609-1>. Acesso em: 25 out. 2023.
- BENCHAMA, O. *et al.* Inhibition of triple negative breast cancer-associated inflammation, tumor growth and brain colonization by targeting monoacylglycerol lipase. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8964799/>. Acesso em: 25 out. 2023.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Dados e números sobre Câncer de mama**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmninnibpcapjpcglclefindmkaj/https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//dados_e_numeros_site_cancer_mama_setembro2022.pdf. Acesso em: 16 abr. 2023.
- CASAUBON, J. T. *et al.* BRCA 1 and 2. **StatPearls**, Treasure Island, set. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>. Acesso em: 16 abr. 2023.
- CHANDRASHEKAR, D. S. *et al.* UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. **Neoplasia**, New York, v. 19, n. 8, p. 649, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5516091/>. Acesso em: 12 set. 2023.
- FAN, Y.; HE, S. The Characteristics of Tumor Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer. **Cancer Management and Research**, v. 14, n. 1, jan. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8740624/>. Acesso em: 16 abr. 2023.
- FORERO, A. *et al.* Expression of the MHC class II pathway in triple-negative breast cancer tumor cells is associated with a good prognosis and infiltrating lymphocytes. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 5, p. 390–399, mai. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4878913/>. Acesso em: 04 nov. 2023.

GENECARDS. C16orf89 Gene - Chromosome 16 Open Reading Frame 89. **Genecards**, 2023. Disponível em:

[https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C16orf89#:~:text=C16orf89%20\(Chromosome%2016%20Open%20Reading,gene%20include%20protein%20homodimerization%20activity](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C16orf89#:~:text=C16orf89%20(Chromosome%2016%20Open%20Reading,gene%20include%20protein%20homodimerization%20activity). Acesso em: 25 out. 2023.

GROMOV, P. *et al.* FABP7 and HMGCS2 are novel protein markers for apocrine differentiation categorizing apocrine carcinoma of the breast. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, nov. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229141/>. Acesso em: 04 nov. 2023.

HERBELE, H. *et al.* InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 169, 2015.

HUA, X. *et al.* IQGAP3 Overexpression Correlates With Poor Prognosis and Radiation Therapy Resistance in Breast Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, jan. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7840781/>. Acesso em: 25 out. 2023.

JABBARI, K. *et al.* CD36+ Fibroblasts Secrete Protein Ligands That Growth-Suppress Triple-Negative Breast Cancer Cells While Elevating Adipogenic Markers for a Model of Cancer-Associated Fibroblast. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, nov. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9654220/>. Acesso em: 04 nov. 2023.

KABIR, M. H. *et al.* Identification of active signaling pathways by integrating gene expression and protein interaction data. **BMC Syst Biol**, v. 12, n. 9, p. 120, dez. 2018. Disponível em: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12918-018-0655-x#citeas>. Acesso em: 12 set. 2023.

KING, J. L. *et al.* TTK promotes mesenchymal signaling via multiple mechanisms in triple negative breast cancer. **Oncogenesis**, v. 7, n. 9, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41389-018-0077-z>. Acesso em: 04 nov. 2023.

KULASINGHE, A. *et al.* Spatial Profiling Identifies Prognostic Features of Response to Adjuvant Therapy in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8784863/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

KUMAR, N. *et al.* CAMP regulated EPAC1 supports microvascular density, angiogenic and metastatic properties in a model of triple negative breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 10, p. 1245–1253, jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6454463/>. Acesso em: 04 nov. 2023.

LEHMANN, B. D. *et al.* Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-26502-6#Sec12>. Acesso em: 16 abr. 2023.

- LI, L. *et al.* Advances in holliday junction recognition protein (HJURP): Structure, molecular functions, and roles in cancer. **In *Frontiers in Cell and Developmental Biology***, v. 11, mar. 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1106638/full#:~:text=Interestingly%20another%20recent%20study%20showed,et%20al.%202022>. Acesso em: 04 nov. 2023.
- LI, Y., *et al.* Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. ***Journal of Hematology & Oncology***, v. 15, n. 121, p. 1-30, ago. 2022. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01341-0#citeas>. Acesso em: 16 abr. 2023.
- LIU, J. *et al.* Unconventional protein post-translational modifications: the helmsmen in breast cancer. **In *Cell and Bioscience***, v. 12, n. 1, 2022. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-022-00756-z>. Acesso em: 04 nov. 2023.
- LIU, J.; ZHANG, J. Elevated EXO1 expression is associated with breast carcinogenesis and poor prognosis. ***Annals of Translational Medicine***, v. 9, n. 2, p. 135–135, jan. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7867906/>. Acesso em: 25 out. 2023.
- LV, X., *et al.* Identification of potential key genes and pathways predicting pathogenesis and prognosis for triple-negative breast cancer. ***Cancer Cell International***, v. 19, n. 1, jun. 2019. Disponível em: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-019-0884-0>. Acesso em: 25 out. 2023.
- MAH, E. J. *et al.* Collagen density modulates triple-negative breast cancer cell metabolism through adhesion-mediated contractility. ***Scientific Reports***, v. 8, n. 1, out. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6244401/>. Acesso em: 04 nov. 2023.
- MAO, M. *et al.* HJURP regulates cell proliferation and chemo-resistance via YAP1/NDRG1 transcriptional axis in triple-negative breast cancer. ***Cell Death and Disease***, n. 13, v. 4, abr. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-04833-6>. Acesso em: 25 out. 2023.
- NADERI, A. *C1orf64* is a novel androgen receptor target gene and coregulator that interacts with 14-3-3 protein in breast cancer. ***Oncotarget***, v. 8, n. 34, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694836/>. Acesso em: 25 out. 2023.
- NAIK, A. *et al.* Cancer testis antigen PRAME: An anti-cancer target with immunomodulatory potential. ***Journal of Cellular and Molecular Medicine***, v. 25, n. 22, p. 10376, nov. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8581324/>. Acesso em: 12 set. 2023.
- NAIK, A.; DECOCK, J. Lactate Metabolism and Immune Modulation in Breast Cancer: A Focused Review on Triple Negative Breast Tumors. **In *Frontiers in Oncology***, v. 10, nov. 2020.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.598626/full>.

Acesso em: 25 out. 2023.

OLIVEIRA, N. S.; RECH, N.; SILVA, S. A. Análise de genes diferencialmente expressos: uma abordagem metodológica in silico. **Revista UNILUS ensino e pesquisa**, v. 20, n. 58, jan./mar. 2023.

ORLANDINI, L. F. *et al.* Epidemiological Analyses Reveal a High Incidence of Breast Cancer in Young Women in Brazil. **Journal of Global Oncology**, v. 7, p. 81–88, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8081493/>. Acesso em: 25 out. 2023.

PARET, C. *et al.* CXorf61 is a target for T cell based immunotherapy of triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694836/>. Acesso em: 25 out. 2023.

PARK, J. H.; PYUN, W. Y.; PARK, H. W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**, v. 9, n. 10, out. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7602974/>. Acesso em: 14 set. 2023

PELUFFO, G. *et al.* EN1 is a transcriptional dependency in triple-negative breast cancer associated with brain metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 16, p. 4173–4183, ago. 2019. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/79/16/4173/638361/EN1-Is-a-Transcriptional-Dependency-in-Triple>. Acesso em: 25 out. 2023.

REBBECK, C. A. *et al.* Gene expression signatures of individual ductal carcinoma in situ lesions identify processes and biomarkers associated with progression towards invasive ductal carcinoma. **Nature Communications**, v. 1, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-30573-4>. Acesso em: 25 out. 2023.

RODRIGUEZ-ESTEBAN, R.; JIANG, X. Differential gene expression in disease: A comparison between high-throughput studies and the literature. **BMC Medical Genomics**, v. 10, n. 1, p. 1–10, out. 2017. Disponível em: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-017-0293-y>. Acesso em: 12 set. 2023.

SELMIN, O. *et al.* Epigenetic Regulation and Dietary Control of Triple Negative Breast Cancer. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 159, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00159/full>. Acesso em: 20 abr. 2023.

SHI, Q. *et al.* Breast cancer-associated SNP rs72755295 is a cis-regulatory variation for human EXO1. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45, n. 4, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36255267/>. Acesso em: 25 out. 2023.

SOLA-PENNA, M. *et al.* Serotonin activates glycolysis and mitochondria biogenesis in human breast cancer cells through activation of the Jak1/STAT3/ERK1/2 and adenylate cyclase/PKA, respectively. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 2, p. 194–208, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-019-0640-1>. Acesso em: 04 nov. 2023.

TAN, Z. *et al.* Identification of Potential Biomarkers for Progression and Prognosis of Bladder Cancer by Comprehensive Bioinformatics Analysis. **Journal of Oncology**, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9042640/>. Acesso em: 25 out. 2023.

TANG, M. *et al.* Increased CDCA2 Level Was Related to Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma and Associated With Up-Regulation of Immune Checkpoints. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8964461/>. Acesso em: 25 out. 2023.

VISHNUBALAJI, R.; ALAJEZ, N. M. Epigenetic regulation of triple negative breast cancer (TNBC) by TGF- β signaling. **Sci Rep**, n. 11, jul. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8322425/>. Acesso em: 12 set. 2023.

WANG, Y. *et al.* HMGCS2 mediates ketone production and regulates the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Cancers**, v. 11, n. 12, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966636/>. Acesso em: 25 out. 2023.

WANG, Z.; JIANG, Q.; DONG, C. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer. **In Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 1, pp. 44–59, fev. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7142847/>. Acesso em: 25 out. 2023.

WU, J. R. *et al.* Estrogen receptor 1 and progesterone receptor are distinct biomarkers and prognostic factors in estrogen receptor-positive breast cancer: Evidence from a bioinformatic analysis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 121, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219352692>. Acesso em: 25 out. 2023.

WU, Q. *et al.* PRMT inhibition induces a viral mimicry response in triple-negative breast cancer. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 8, p. 821-830, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41589-022-01024-4>. Acesso em: 16 abr. 2023.

XIA, S. *et al.* SLC7A2 deficiency promotes hepatocellular carcinoma progression by enhancing recruitment of myeloid-derived suppressors cells. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 6, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03853-y>. Acesso em: 25 out. 2023.

XU, S. *et al.* ASPM promotes homologous recombination-mediated DNA repair by safeguarding BRCA1 stability. **IScience**, v. 24, n. 6, jun. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8184511/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ZHANG, H. *et al.* Galectin-3 as a Marker and Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25254965/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ZHAO, W. *et al.* Identification of PIMREG as a novel prognostic signature in breast cancer via integrated bioinformatics analysis and experimental validation. **PeerJ**, v. 11, jul. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10358341/>. Acesso em: 04 nov. 2023.

ZHAO, Z. M. *et al.* CCNE1 amplification is associated with poor prognosis in patients with triple negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, jan. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6341717/>. Acesso em: 04 nov. 2023.

ZHENG, C. *et al.* Neutrophils in triple-negative breast cancer: an underestimated player with increasingly recognized importance. **In Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, 2023. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-023-01676-7>. Acesso em: 04 nov. 2023.