

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DELLYANA RODRIGUES BOBERG

**ANÁLISE DA ALTERAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E EXPRESSÃO DOS GENES
ACHE, EPHB4, BCHE E *MME*, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA
ESPORÁDICO.**

**CURITIBA
2013**

DELLYANA RODRIGUES BOBERG

**ANÁLISE DA ALTERAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E EXPRESSÃO DOS GENES
ACHE, EPHB4, BCHE E *MME*, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA
ESPORÁDICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lupe Furtado Alle

**CURITIBA
2013**

DEDICATÓRIA

Para minha filha Clara.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza e à minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Lupe Furtado Alle, pela oportunidade e por toda a ajuda durante os 4 anos de trabalho no laboratório de polimorfismo e ligação.

À Prof^a Dr^a Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Prof^a Dr^a Liya Regina Mikami, Prof^a Dr^a Karin Braun Prado, Prof. Dr. Marcos Euzebio Maciel, por terem aceitado fazer parte da Banca Avaliadora dessa tese.

À Prof^a Dr^a Eleidi Alice Chautard Freire Maia e novamente à Prof^a Dr^a Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro por terem feito parte da banca de acompanhamento e me auxiliarem grandemente durante a elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética e ao Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, por disponibilizarem materiais e equipamentos indispensáveis para a realização desta pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, em especial ao Prof. Dr. Marcos Euzebio Maciel e a doutoranda Sarah Oliveira pela paciência e ajuda no meu contato inicial com a técnica de PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Marcio Marque de Moraes por me ajudar incansavelmente em todas as etapas em que a técnica de PCR em tempo real resolveu não funcionar.

À Dr^a Aline Freund, pelos preciosos conselhos que tornaram possível a realização da curva padrão.

A todos os colegas de Pós-graduação, especialmente Pati, Tay, Tha, Car, Carol, Re e Má, pela eterna amizade.

Aos professores da Pós-graduação e do departamento de genética, por todo o aprendizado. Em especial à Prof^a Dr^a Marina Isabel Mateus de Almeida, por confiar no meu trabalho de auxílio à graduação pelo REUNI e pelos ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

Aos secretários Murilo e Dirce, pela eficiente ajuda nos processos burocráticos.

A todos os colegas de laboratório do polimorfismo, pela adorável companhia, pelo aprendizado, pelo respeito e pelo carinho nesses anos de convivência.

À minha parceira de laboratório, meu braço direito e o lado esquerdo do meu cérebro, Meire Batistela, pela eterna amizade, pelo incansável apoio na bancada e na escrita e por não me deixar desistir. Sem você esse doutorado não existia.

Aos meus pais, por serem os melhores pais/avós do mundo. Muito obrigada por todo o apoio, compreensão, ensinamento e amor que sempre me deram.

À minha filha, pela incrível compreensão da minha ausência e assim mesmo sempre me incentivar.

RESUMO

Alterações na estrutura e na expressão de alguns genes são eventos comuns na formação e progressão de diversos tumores e possuem relevância na busca por marcadores de neoplasia ou ainda para a classificação e caracterização molecular de tumores. Existem na literatura alguns relatos de que as regiões onde estão localizados os genes *ACHE* e *EPHB4* (7q22) e os genes *BCHE* e *MME* (3q26) apresentam amplificações e deleções em diversos tipos de câncer. Além disso, os produtos desses genes têm sido descritos com alterações no nível de expressão nessa doença. Com o objetivo de verificar se esses genes estão sofrendo alterações no número de cópias, analisamos 32 amostras de DNA do tumor e do sangue periférico de pacientes de câncer de mama, usando a técnica de qPCR e quantificando pelo método da curva padrão. Os genes *ACHE* e *EPHB4* apresentaram uma tendência a estar amplificado (62,5% vs. 37,5%; $p > 0,1$; e 53,13% vs. 46,88%; $p > 0,5$; respectivamente) e os genes *BCHE* e *MME* uma tendência a estarem deletados (56,25% vs. 43,75% em ambos; $p > 0,5$). Essas alterações obtidas nos conjuntos de genes localizados proximamente (*ACHE-EPHB4* e *BCHE-MME*) mostraram correlação (r_s 0.5948; $p = 0.0004$; $r_s = 0.3581$; $p = 0.0478$ respectivamente), indicando uma concordância na alteração da estrutura dessas regiões cromossômicas. Adicionalmente avaliamos a expressão relativa desses genes em 45 amostras de carcinoma mamário e em 8 amostras de tecido normal. Essa análise foi feita por RT-qPCR utilizando o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Observou-se que a expressão dos genes *BCHE* e *MME* encontra-se baixa em quase todas as amostras tumorais (95,6%), no entanto, os genes *ACHE* e *EPHB4* não apresentam diferença no número de amostras com maior e menor expressão em tumores. A média de expressão de *BCHE* e *MME* é significativamente maior no tecido normal do que no tumoral ($Z = -3,702$; $p < 0,001$ e $Z = -4,120$; $p < 0,001$, respectivamente). Para os genes *ACHE* e *EPHB4* essa diferença não é observada ($Z = -0,870$; $p = 0,385$ e $Z = -0,025$; $p = 0,98$, respectivamente). Correlacionou-se as alterações no número de cópias com os níveis de expressão relativa e verificou-se que não existe relação direta entre esses dois fatores para os genes estudados. Também não foi encontrado nenhuma relação dessas alterações com os parâmetros histopatológicos de cada paciente. Como conclusão, nota-se que não há uma relação causal direta dessa alteração do número de cópias com o desenvolvimento do tumor, podendo ser esta uma consequência do processo neoplásico, e que de alguma forma torna-se vantajoso para a progressão da doença. Além disso, pode-se observar também que o perfil de baixa expressão dos genes *BCHE* e *MME* é um comportamento característico desses genes no tecido tumoral, e por não ter relação direta com a tendência à deleção, propõe-se que possa ser regulada por algum outro fator, provavelmente algum evento epigenético. Já o perfil de expressão semelhante dos genes *ACHE* e *EPHB4* nos dois tecidos nos permite sugerir que o padrão de expressão obtido para esses genes pode ser um evento comum na mama, parecendo não ser influenciado pelo processo de carcinogênese.

Palavras-chave: alteração do número de cópias, expressão gênica relativa, câncer de mama, região 7q22, região 3q26.

ABSTRACT

Changes in the structure and expression of some genes are common events in the formation and progression of several tumors and have relevance in the search for neoplasia markers or for the molecular characterization and classification of tumors. The regions where the *ACHE* and *EPHB4* (7q22) and *BCHE* e *MME* (3q26) genes are mapping has been reported suffering amplifications and deletions in several types of cancer. And the products of these genes are described as showing changes in the level of expression in this disease. Aiming to verify whether these genes are undergoing copy number variation, we analyzed 32 samples of DNA from tumor and peripheral blood of breast cancer patients, using the qPCR technique and quantify by standard curve method. The *ACHE* and *EPHB4* genes tended to be amplified (62,5% vs. 37,5%; $p > 0,1$; e 53,13% vs. 46,88%; $p > 0,5$; respectively) and *BCHE* and *MME* genes a tendency to be deleted (56,25% vs. 43,75% both; $p > 0,5$). Sets of genes close (*ACHE-EPHB4* and *BCHE-MME*) showed that their variations are correlated (r_s 0.5948; $p = 0.0004$; $s = 0.3581$; $p = 0.0478$ respectively). Further, assess the relative expression of these genes in 45 breast carcinoma samples and 8 of normal tissue. This analysis was performed by RT-qPCR using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). The expression of *BCHE* and *MME* genes is lower in almost every tumor samples (95,6%) and the *ACHE* and *EPHB4* genes have no difference to the amount of overexpression and lowexpression samples in this tissue. The mean expression of *BCHE* and *MME* is significantly higher in normal tissue than ($Z = -3,702$; $p < 0,001$ e $Z = -4,120$; $p < 0,001$, respectively). To the *ACHE* and *EPHB4* genes this difference does not exist ($Z = -0,870$; $p = 0,385$ e $Z = -0,025$; $p = 0,98$, respectively). Correlated the copy number variation to relative expression levels, however find that there is no direct relationship between these two factors for the genes studied. Found no relation of these alterations with histopathological parameters of each patient. It is possible to suggest that the low expression profile of *BCHE* and *MME* genes is a characteristic behavior in tumor tissue and having failed to direct relation with the tendency to deletion, it is proposed that this differential expression may be regulated by some other factor probably epigenetic. The same expression profile of the *ACHE* and *EPHB4* genes in both tissues, as well as the fact that the amount of transcript overexpressed and lowexpressed be equal in breast carcinoma, allows us suggest that the expression pattern obtained for these genes may be a common event in breast, seems not to be influenced by the process of carcinogenesis

Keywords: copy number variation, relative gene expression, breast cancer, 7q22 region, 3q26 region.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Gene <i>ACHE</i> e suas variantes produzidas por recomposição alternativa.....	15
FIGURA 2	Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i> com os 4 exons e 3 introns...	17
FIGURA 3	Estrutura esquemática da neprilisina.....	18
FIGURA 4	Esquema do gene <i>MME</i> e seus 4 tipos de transcritos.....	19
FIGURA 5	Figura esquemática da estrutura do receptor Eph e seu ligante Efrina.....	21
FIGURA 6	Fases da curva de amplificação produzida durante a reação de PCR	67
FIGURA 7	Esquema do sistema de detecção Taqman utilizando sondas marcadas com fluorescentes.....	68
FIGURA 8	Esquema da placa de 96 poços contendo uma curva padrão, 13 amostras de sangue (S) e tumor (T) e o controle negativo.....	69
FIGURA 9	Curva padrão com cinco pontos de diluição, no detalhe, valores referentes de eficiência.....	70
FIGURA 10	Amostra quantificada (em ng) em relação à curva padrão.....	71
FIGURA 11	Esquema da placa de 96 poços contendo 3 reações dos genes alvo e dos genes de referência, o controle positivo e o controle negativo..	76
FIGURA 12	Teste de estabilidade dos genes de referência <i>ACTB</i> , <i>18S</i> e <i>PUM1</i> ..	77
FIGURA 13	Gráfico mostrando alterações (%) sofridas pelos genes <i>ACHE</i> e <i>EPHB4</i>	79
FIGURA 14	Gráfico mostrando alterações (%) sofridas pelos genes <i>BCHE</i> e <i>MME</i>	79
FIGURA 15	Gráficos mostrando correlação positiva entre os valores de Q dos genes da região 7q22 (<i>ACHE-EPHB4</i>) e os genes da região 3q26 (<i>BCHE-MME</i>).....	80
FIGURA 16	Gráficos mostrando as alterações na expressão (%) dos genes <i>BCHE</i> e <i>MME</i>	81
FIGURA 17	Gráficos mostrando a alterações na expressão (%) dos genes <i>ACHE</i> e <i>EPHB4</i>	82

FIGURA 18	Gráfico de correlação entre os valores de expressão relativa dos genes <i>BCHE</i> e <i>MME</i>	82
FIGURA 19	<i>Fold Change</i> de cada amostra para os genes <i>ACHE</i> e <i>EPHB4</i> , no tecido tumoral.....	84
FIGURA 20	<i>Fold Change</i> de cada amostra para os genes <i>BCHE</i> e <i>MME</i> , no tecido tumoral.....	85
FIGURA 21	Porcentagem das amostras alteradas (mais expressas e menos expressas) no tecido tumoral e tecido normal.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Informações histopatológicas das pacientes.....	10
TABELA 2	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados na qPCR.....	11
TABELA 3	Informações histopatológicas das pacientes.....	12
TABELA 4	Parâmetros do valor de quantificação da expressão relativa (FC) das 45 amostras de tecido tumoral e das 8 amostras de tecido normal, e seus respectivos valores de t e p	13

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
Aspectos gerais das colinesterases.....	13
Acetilcolinesterase.....	14
Butirilcolinesterase.....	15
Neprilisina.....	17
Receptor EphB4.....	20
Câncer de mama.....	21
Alterações gênicas.....	23
Colinesterases e o câncer.....	24
Neprilisina e o câncer.....	26
Ephb4 e o câncer.....	28
OBJETIVO	30
Objetivo geral.....	30
Objetivo específico.....	30
JUSTIFICATIVA	31
CAPÍTULO I	32
CAPÍTULO II	37
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE I	64
APÊNDICE II	73
APÊNDICE III	79

INTRODUÇÃO

No sangue humano encontramos duas enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ésteres de colina como a acetilcolina, são elas: a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. A primeira é encontrada em várias partes do corpo, mas principalmente nas junções neuromusculares, desempenhando papel importante na neurotransmissão colinérgica (MASSOULIÉ *et al.*; 1993). Já a butirilcolinesterase é produzida pelo fígado e distribuída por todo o organismo. Embora ainda não esteja bem definida sua função biológica, é sabido que hidrolisa preferencialmente a butirilcolina (WHITTAKER, 1980), mas também é responsável pelo metabolismo de anestésicos como a procaína (GALENKO-YAROSHEVSKII, 2003)

Em nosso organismo encontramos também endopeptidases, ou endoproteínases, que catalisam a quebra de ligações peptídicas entre aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, uma família dessas enzimas é a metaloendoprotease, que possui um metal no seu sítio ativo. A neprilisina, uma proteína integral de membrana pertencente à família das metaloendopeptidases exerce função de metabolizar pequenos peptídeos como hormônios e neuropeptídeos. É encontrada na superfície de vários tipos celulares como no tecido renal, intestino, linfonodos, endotélio vascular e na célula neural (TURNER; TANZAWA, 1997).

Somado a isso, incluímos a família Eph de receptores de tirosina quinase, uma importante classe de proteína de transdução de sinais que modulam o crescimento, proliferação, sobrevivência e a diferenciação celular, além da adesão célula-substrato. (SAHA *et al.*, 2007; PASQUALE, 2005). Esses receptores são classificados de acordo com a afinidade de seus ligantes, sendo receptores de efrinas tipo-A e tipo-B. Para esse trabalho escolhemos o receptor de efrina tipo B4 (EphB4), um dos receptores mais estudados em câncer. (NOREM; PASQUALE, 2007)

Essas quatro proteínas vêm demonstrando forte relação com a formação ou manutenção de células tumorais. Essa relação é demonstrada, por exemplo, pela ação das colinesterases no controle da proliferação, adesão e morte celular (LAYER, 1991), ou ainda na alteração de suas expressões contribuindo para a progressão de tumores (SONG *et al.*, 2003), bem como alterações estruturais em seus genes, como amplificações, em células cancerosas (ZAKUT *et al.*, 1990). Já a neprilisina, em determinados tipos de câncer, contribui na supressão deste por inibir fatores de crescimento celular (SHIPP *et al.*, 1991), mas em outros tipos, o aumento da sua expressão pode desencadear a proliferação celular e com isso a progressão do tumor

(BAI *et al.*, 2003). Por atuar num complexo sistema de comunicação celular, o receptor EphB4 tem sido envolvido em uma vasta gama de doenças. Esses receptores participam ainda da migração e invasão de células tumorais, além da formação dos vasos sanguíneos que alimentam o tumor e regulam as propriedades das células cancerosas. (PASQUALE, 2008)

Diante das evidências de influência dessas enzimas no processo de tumorigênese, e do conhecimento de que suas alterações gênicas, como ampliações, deleções e expressão diferenciada, podem interferir na origem e desenvolvimento dessa doença, se faz importante a realização de estudos mais abrangentes acerca do comportamento dessas modificações genéticas nesses genes, a fim de possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na formação e progressão do câncer.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aspectos gerais das colinesterases

As colinesterases são esterases que hidrolisam ésteres de colina, como o neurotransmissor acetilcolina. Essa reação permite que o neurônio colinérgico volte ao estado de repouso após a ativação, evitando assim um acúmulo desse neurotransmissor, que produziria um super estímulo do músculo e, como consequência, debilidade e cansaço (GOODSELL, 2004). No sangue humano duas enzimas hidrolisam a acetilcolina: a acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7 AChE) e a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8 BChE).

A BChE humana possui homologia de 54% em sua sequência de aminoácidos com a AChE de *Torpedo californica*, e identidade em suas estruturas do sítio ativo por possuírem os resíduos de serina, histidina e glutamato, considerados importantes para a atividade catalítica de ambas (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989). Embora apresentem algumas semelhanças, AChE e BChE são codificadas por genes distintos (GNATT *et al.*, 1991), no entanto esses genes podem ter surgido a partir de um precursor comum (SMALL; MICHAELSON; SBERNA, 1996).

Essas enzimas podem ser distinguidas pela especificidade ao substrato e sensibilidade à inibição por organofosforados, sendo a BChE mais sensível a esse tipo de inseticida que a AChE (STURM, 2000). A AChE exibe uma especificidade para a acetilcolina e é responsável pela hidrólise desse neurotransmissor nas sinapses colinérgicas, enquanto a BChE não é tão específica e catalisa a hidrólise da acetilcolina e de outros ésteres (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989).

Em estudo da comparação entre acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, Chatonnet e Lockridge (1989) ressaltam as diferenças na expressão durante a diferenciação e desenvolvimento dos tecidos, sendo uma colinesterase substituída pela outra durante o desenvolvimento, sugerindo uma complementaridade dos papéis da AChE e BChE.

AChE e BChE se apresentam em formas moleculares globulares, como o monômero (G1), dímero (G2) e tetrâmero (G4). Já as formas assimétricas A_4 , A_8 e A_{12} , encontradas somente na AChE, têm como subunidade de um a três tetrâmeros ligados por pontes de dissulfeto associados a uma fita de colágeno (MASSOULIÉ; BON, 1982) por meio da qual são fixadas à membrana basal em vários locais, como nos eritrócitos e

na placa motora terminal (RANG; DALE; RITTER, 2001). A forma G4 está provavelmente localizada na membrana celular e a forma A12 nos sítios sinápticos.

Acetilcolinesterase

Também chamada de colinesterase verdadeira, a acetilcolinesterase é um componente essencial na neurotransmissão colinérgica por interromper a transmissão dos impulsos nervosos pela hidrólise da acetilcolina na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular. Além das terminações nervosas, pode ser encontrada no cérebro, pulmão, baço e eritrócitos (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

O monômero da AChE é uma proteína alfa/beta (12 folhas β -pregueadas envoltas por 14 α -hélices) que contém 537 aminoácidos. Seu sítio ativo é composto por dois subsítios: o esterásico, o que contém uma tríade catalítica (Ser 200, His 440 e Glu 327), responsável pelas funções catalíticas da enzima, e está localizado no fundo de uma fenda profunda e estreita dentro da proteína (SUSSMAN *et al.*, 1991). O sítio aniônico é carregado negativamente e acomoda o grupo quaternário da acetilcolina, encontra-se na superfície da enzima e parece estar envolvido com a inibição alostérica da mesma, e ainda, na associação de proteínas heterólogas que ocorre durante a sinaptogênese ou na neurodegeneração (BOURNE *et al.*, 2003).

O gene *ACHE* dos mamíferos contém 6 éxons e na espécie humana está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q22) (EHLICH *et al.*, 1992; GETMAN *et al.*, 1992). O éxon 1 contém a região 5' não traduzida, o cerne da AChE, que é comum a todas as variantes, é codificado pelos exons 2,3 e 4. Os éxons 5 e 6 sofrem rearranjos e podem formar variantes dessa enzima (GRISARU *et al.*, 1999).

O pré m-RNA da acetilcolinesterase pode sofrer recomposição alternativa que irá gerar três m-RNAs (BEM AZIZ-ALOYA *et al.*, 1993; TAYLOR; RADIC, 1994). O mais conhecido desses mRNAs codifica a forma sináptica da AChE (S), produzido pelos exons E1-E2-E3-E4-E6, é o principal transcrito no cérebro e tecido muscular (SEIDMANS *et al.*, 1995). O segundo mais comum é formado pela inclusão da transcrição do íntron 4, resultando no transcrito E1-E2-E3-E4-I4-E5-E6 que codifica a forma "readthrough" (R), é expresso em células embrionárias e tumorais e é induzido na resposta ao estresse fisiológico e inibição da AChE (KARPEL *et al.*, 1994; KAUFER *et al.*, 1998). A forma eritrocítica (E) é codificada pelo transcrito E1-E2-E3-E4-E5-E6 e é encontrada na forma de dímeros associados com a membrana dos eritrócitos (KEREM *et al.*, 1993) (LIAO *et al.*, 1992) (FIGURA 1).

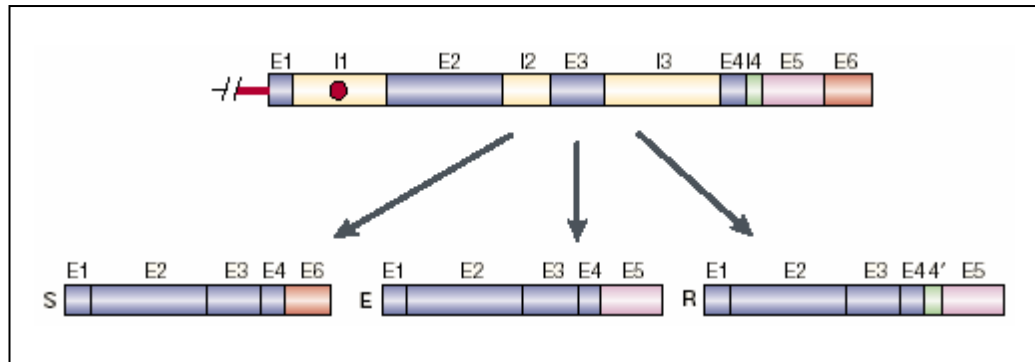


Figura 1 - Gene *ACHE* e suas variantes produzidas por recomposição alternativa: S (sináptica), E (eritrocítica) e R (readthrough). E = exon; I = intron. FONTE: Adaptado de Soreq & Seidman, 2001.

Estudos mostram que a AChE possui atividade extra sináptica, além da sua atividade colinesterásica, entretanto, o seu papel “não-clássico” ainda é incerto em regiões onde a acetilcolina não está presente, como em células hematopoiéticas, osteogênicas e neoplásicas (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Durante o desenvolvimento do sistema neural, a AChE desenvolve um papel morfogênico sugerindo uma função de adesão celular (BIGBEE *et al.* 1999). Também é sugerida a sua participação no processo de diferenciação celular (LAYER, 1991); na hematopoiese, regulando a proliferação de células multipotentes e na apoptose de células submetidas à diferenciação em eritrócitos ou mielócitos (STEPHENSON *et al.*, 1996).

Butirilcolinesterase

A butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), antes chamada de pseudocolinesterase, é sintetizada pelas células hepáticas, e encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE *et al.*, 1947). Atua na hidrólise vários ésteres de colina, e também outros ésteres, como ácido acetilsalicílico (HARRIS, 1980), e outros compostos como cocaína (CARMONA *et al.*, 2000), heroína (LOCKRIDGE *et al.*, 1980) sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina.

A butirilcolinesterase do soro tem um papel chave na hidrólise do relaxante muscular succinilcolina que é administrado durante a anestesia (KALLOW; GUNN, 1959). Pacientes portadores de variantes genéticas da BChE, como por exemplo a *D70G*, podem sofrer apneia prolongada quando submetidos a doses padrões dessa droga.

No plasma humano é possível verificar as cinco formas moleculares principais da butirilcolinesterase existentes no organismo humano: monômero (G1), dímero (G2) e tetrâmero (G4), e também o monômero ligado à albumina sérica (G1-ALB) e o tetrâmero ligado à uma substância desconhecida (C5).

G1 é formado por uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos e nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligadas a nove asparaginas, e o peso molecular é de cerca de 90.000 Da. E os dímeros (G2) são formados pela união de monômeros por uma ligação dissulfeto intercadeias (LOCKRIDGE *et al.*, 1987).

O tetrâmero é a forma mais abundante da BChE no plasma. É uma molécula tetramérica globular, com peso molecular de aproximadamente 340.000 Da. Tem quatro subunidades idênticas arranjadas como dímero de dímeros, isto é, pares de subunidades são covalentemente ligadas através de uma única ligação dissulfeto dentro dos dímeros, e dois desses dímeros são hidrofobicamente ligados dentro do tetrâmero (LOCKRIDGE; LA DU, 1982). As formas moleculares G1, G2 e G4 são parcialmente interconversíveis e as formas G1 e G2 podem ser precursoras e/ou produto da degradação de G4 (LA MOTTA *et al.*, 1968; MASSON, 1979).

O gene da butirilcolinesterase (*BCHE*) está localizado no cromossomo 3 em humanos (3q26.1-q26.2), apresenta um comprimento de 64.560 pb e possui 4 éxons e 3 grandes íntrons (GAUGHAN *et al.*, 1991) (FIGURA 2). O éxon 1 do gene *BCHE* contém sequências não traduzidas, um tamanho de 149 pb e dois potenciais sítios de iniciação da tradução, nos códons -69 e -47. O éxon 2, de 1.525 pb, contém 83% de sequência codificadora para a proteína madura, incluindo o N-terminal, a serina do sítio ativo, e um terceiro possível sítio de iniciação, no códon -28. O éxon 3 possui 167 nucleotídeos e o éxon 4, de 604 pb, codifica a porção C-terminal da proteína e a região 3' UTR, na qual foram identificados 2 sinais de poliadenilação, ambos funcionais (ARPAGAUS *et al.*, 1990). Nesse mesmo estudo, os autores sugerem que esse gene está presente em cópia única no genoma humano.

Embora a função da BChE não esteja completamente esclarecida, é sugerido que tenha participação nos mais diversos processos fisiológicos. Em camundongos *knockout* para a acetilcolinesterase, foi demonstrado que a butirilcolinesterase atua compensando a AChE podendo substituí-la nas junções neuromusculares, protegendo os nervos terminais do acúmulo de acetilcolina, (GIRARD *et al.*; 2007). Em camundongos *knockout* para a butirilcolinesterase também foi observada essa função de hidrólise da acetilcolina, pois animais BChE *-/-* morriam após administração de um

inibidor da AChE. Isso ocorre devido à falta do *backup* normalmente realizado pela BChE (DUYSEN *et al.*, 2007).

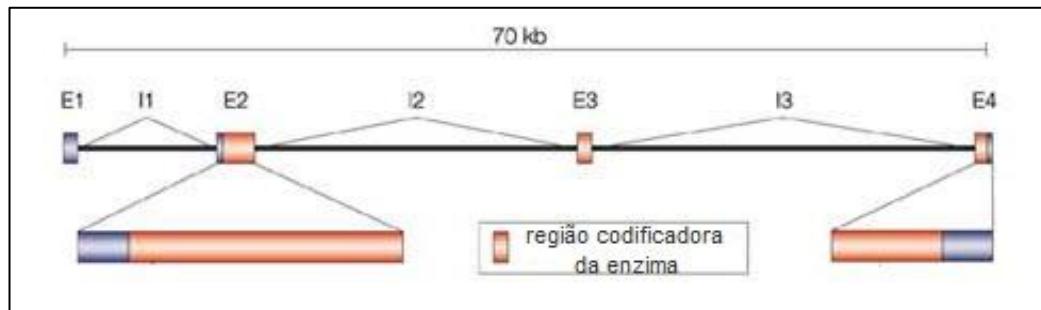


Figura 2 - Desenho esquemático do gene *BCHE* com os 4 exons (E1, E2, E3 e E4) e 3 introns (I1, I2 e I3). FONTE: Darvesh *et al.*, 2003. (Tradução da autora)

Assim como a AChE, a butirilcolinesterase desempenha papel importante na regulação da proliferação celular (LAYER, 1991; LAYER; WILLBOLD, 1995).

Neprilisina

A neprilisina (EC3.4.24.11) é uma proteína integral de membrana tipo II classificada como metaloprotease por conter o metal zinco no seu sítio ativo, pertencendo à família peptidase M13 (RAWLINGS; BARRETT, 1995) Também conhecida por endopeptidase neutra (NEP), CD10, encefalinase e antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA), foi primeiramente relatada como uma enzima capaz de hidrolisar a cadeia B da insulina em coelhos (KERR; KENNY, 1974). Exerce função de endopeptidase hidrolisando oligopeptídeos, com isso, está envolvida no processamento e metabolismo de diversos peptídeos, entre eles hormônios, imunorregulatórios e neuropeptídeos.

Por meio de purificação e sequenciamento de cDNA, Devault *et al.* (1987) revelaram a estrutura primária completa dessa enzima extraída de rim de coelho, mostrando ser constituída por 750 aminoácidos, com um pequeno domínio N-terminal citoplasmático (27 aminoácidos), uma região transmembrana (23 aminoácidos), e um grande domínio extracelular que compreende a maior parte da proteína, onde está o sítio ativo (FIGURA 3). Em comparação com uma metaloproteinase bacteriana, a termolisina, verificou-se homologia nas sequências de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica, conferindo uma semelhança estrutural entre ambas.

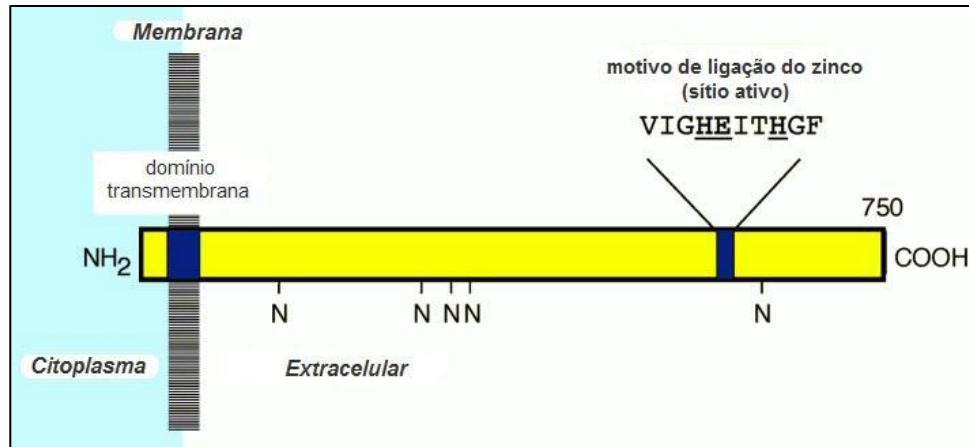


Figura 3 - Estrutura esquemática da neprilisina. FONTE: Saido & Nakahara, 2000. Tradução da autora.

A NEP humana foi descrita a partir de estudo com placenta, apresentando uma sequência de 742 aminoácidos, uma única região transmembrana próxima ao N-terminal, e a maior parte da proteína localizada extracelularmente, mostrando uma alta homologia com essa enzima em coelhos e ratos (MALFROY *et al.*, 1988).

É normalmente expressa por vários tecidos do corpo, sendo muito abundante na superfície das células do rim com borda em escova e em menor quantidade no intestino, linfonodos, condrócitos, várias glândulas (salivar, adrenal, hipófise e pâncreas) (GEE *et al.*, 1985), células epiteliais, fibroblastos (PAINTER *et al.*, 1988) pulmão, neutrófilos e endotélio vascular (JOHNSON *et al.*, 1985).

Uma de suas características é ser potencialmente inibida pelo fosforamidon, um produto da bactéria *Streptomyces*, anteriormente identificado como inibidor da termolisina. O uso do fosforamidon foi muito importante no primeiro estudo sobre a função biológica da neprilisina realizado com o metabolismo das encefalinas, um neurotransmissor opióide que modula as emoções e a dor (MALFROY *et al.*, 1978; SCHWARTZ *et al.*, 1980). A NEP está localizada na célula neural como uma enzima sináptica onde pode inativar a liberação das encefalinas (de onde vem o nome encefalinase), e outros neuropeptídeos como a substância P (MATSAS *et al.*, 1983). Por essa razão é considerada como uma “colinesterase” das sinapses peptidérgicas (TURNER; TANZAWA, 1997).

Além das encefalinas, há uma variedade de outros substratos hidrolisados pela neprilisina, como ocitocina, [leu] e [met]-encefalinas, neurotensina, bombesina (ROQUES *et al.*, 1993; TURNER; TANZAWA, 1997) e o peptídeo vasodilatador natriurético atrial (ANP) (KENNY; STEPHENSON, 1988). No pulmão é capaz de limitar inflamações neurogênicas iniciadas por taquiquininas (SHIPP *et al.*, 1991). A descoberta

de alguns substratos da neprilisina, particularmente o ANP e as encefalinas permitiram maiores estudos do seu uso terapêutico no tratamento da hipertensão, dor e diarreia (ROQUES *et al.*, 1993; ROQUES; BEAUMONT, 1993).

A estrutura do gene da neprilisina (*MME*) foi obtido através de cDNA e clone genômico correspondente ao gene do antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA). O gene é copia única, pouco maior que 80 kb. A sua localização foi revelada por hibridização *in situ*, sendo encontrado no cromossomo 3, na região 3q21-27 (BARKER *et al.*, 1989).

Inicialmente foi descrito por D'Adamio *et al.* (1989) como composto por 24 exons, sendo que os exons 1 e 2 pertencem à região 5' não traduzida e o exon 3 (170pb) codifica o códon de início de tradução, o domínio citoplasmático e o hidrofóbico. Vinte pequenos exons (do 4 ao 23) codificam a maior parte extracelular da enzima. O exon 24 (aproximadamente 3400 pb) codifica 32 aminoácidos da porção C-terminal e a região 3' não traduzida. Três novos tipos de cDNAs foram identificados contendo sequências diferentes da 5' UTR, resultantes de recomposição alternativa dos exons 1, 2a ou 2b. Analisando a região 5', Haouas *et al.* (1995) demonstraram a existência de vários sítios de início de transcrição e de recomposição que podem estar relacionados com a especificidade da expressão dessa enzima, tanto na origem dos tecidos como no estágio de desenvolvimento (FIGURA 4).

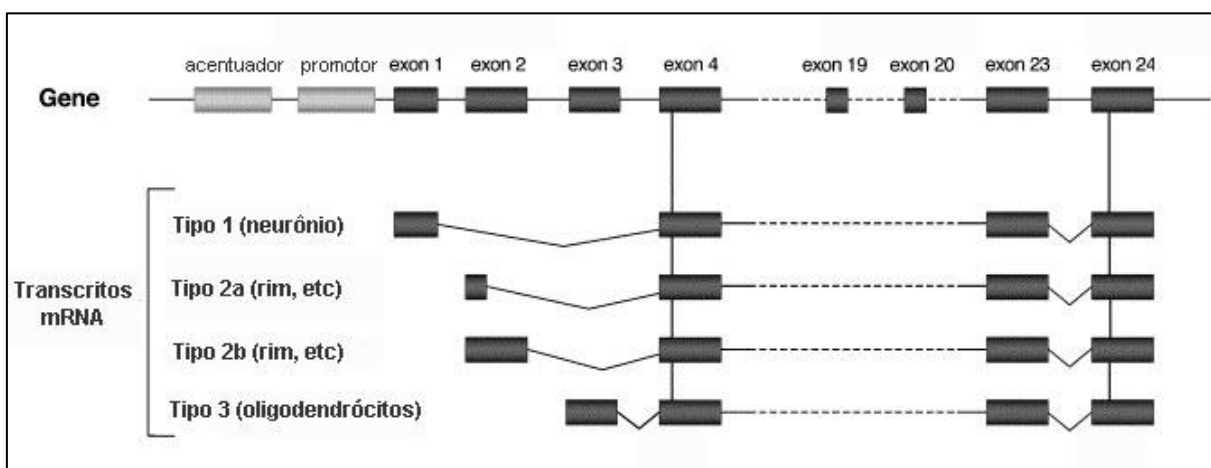


Figura 4 – Esquema do gene *MME* e seus 4 tipos de transcritos produzidos com diferentes estruturas na região 5' UTR. FONTE: Adaptado de Iwata *et al.*, 2005. (Tradução da autora)

Neprilisina está associada com leucemia, apresentando 100% de identidade na sequência de aminoácidos do antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA) e associando-se principalmente com os precursores dos linfócitos B (LETARTE *et al.*,

1988), sendo um importante marcador da superfície celular no diagnóstico da leucemia linfocítica aguda (GREAVES *et al.*, 1975; QUACKENBUSH; LETARTE, 1985). É também expressa em diversos tipos de células malignas.

Receptor EphB4

Eph e seus ligantes (efrinas) formam a maior subfamília dos receptores de tirosina quinase, que são uma importante classe de proteína de transdução de sinais que modulam o crescimento e a diferenciação, e foram descritos pela primeira vez por Hirai *et al* (1987) como contendo uma região rica em cisteína no domínio extracelular. Representam o principal sistema de comunicação celular e tem sido envolvido em uma vasta gama de processos fisiológicos e de doenças. Esses receptores participam ainda da formação dos vasos sanguíneos, incluindo vasos sanguíneos que alimentam o tumor e regulam as propriedades das células cancerosas. (PASQUALE, 2008)

As efrinas são moléculas de sinalização intracelular que juntamente com seus receptores medeiam vários processos de desenvolvimento. As efrinas são classificadas de acordo com suas estruturas e sequências, sendo divididas em efrinas tipo-A, que são ancorados à membrana por uma cauda; e tipo-B, que são proteínas transmembrana. Conseqüentemente, os receptores de efrinas (Eph) são classificados de acordo com as afinidades de seus ligantes, sendo estes receptores de efrinas tipo-A e tipo-B.

Como o receptor de efrina e seu ligante são encontrados na membrana celular é possível que ocorra uma sinalização bidirecional, ou seja, feita pelos receptores e pelos ligantes na célula que estão ancorados. Convencionalmente os receptores agem adiante enquanto as efrinas ativam um sinal reverso (FIGURA 5). Na sinalização adiante, os sinais são transmitidos por meio da atividade tirosina quinase do receptor. Na sinalização reversa, a porção extracelular do receptor faz com que as efrinas transmitam sinais pela fosforilação da sua região citoplasmática. (BRÜCKNER E KLEIN, 1998; KALO; PASQUALE, 1999; HIMANEN; NIKILOV, 2003).

Bennett *et al.* (1994) identificaram uma nova tirosina quinase transmembrana em células humanas de carcinoma hepatocelular, chamada de quinase transmembrana hepatoma (HTK). Essa proteína compartilha aminoácidos, mesma localização cromossômica do gene e outras características com a subfamília Eph. Atualmente essa quinase recebe o nome de EphB4. Esse mesmo estudo ainda descreveu que o gene humano *EPHB4* estaria localizado no cromossomo 7, na região 7q22.1. Possui 17 pequenos exons e um transcrito de 4.329 pb

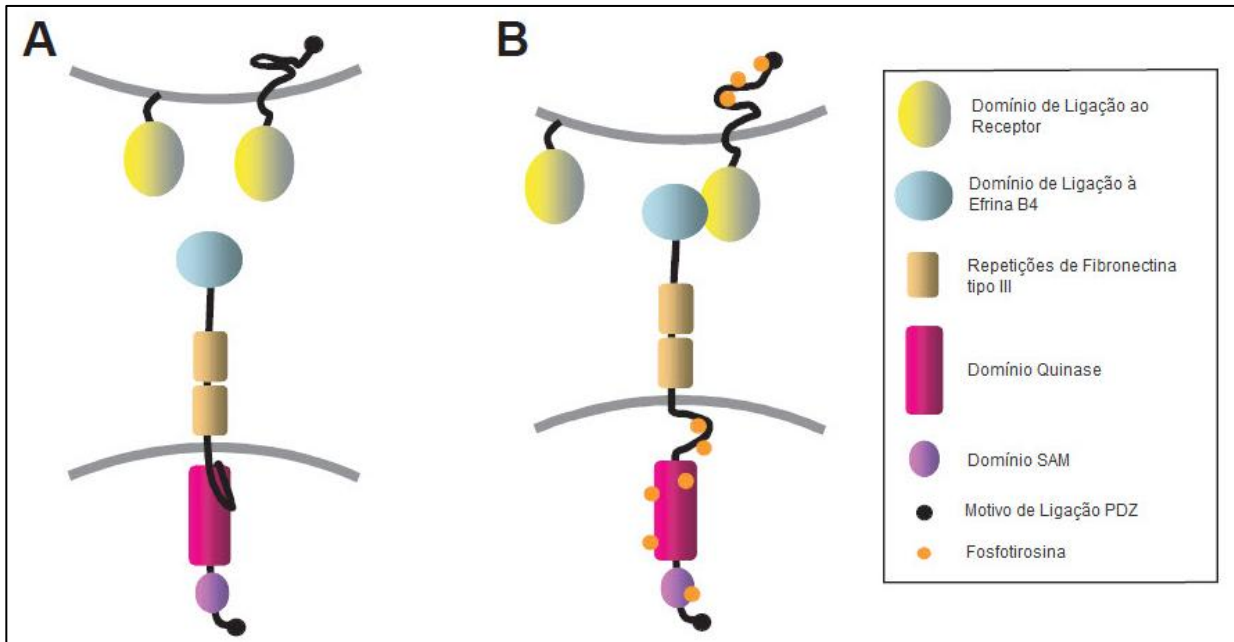


Figura 5 – (A) figura esquemática da estrutura do receptor Eph e seu ligante Efrina (tipo A à esquerda e tipo B à direita). (B) o acoplamento receptor-ligante induz a sinalização bidirecional. Tanto o receptor Eph quanto a efrina-B tornam-se fosforilados. Fonte: Murai & Pasquale, 2003. Tradução da autora.

Em tecido adulto, EphB4 é transcrito em altos níveis no fígado, pulmão, rins, intestino, placenta, músculo e coração. É também expresso no desenvolvimento da glândula mamária e superexpresso em tumores de mama invasivos. Em contraste com a maioria dos receptores de efrinas, EphB4 não tem significativa expressão no cérebro (ANDRES *et al.*, 1994; BENNETT *et al.*, 1994; CIOSSEK *et al.*, 1995).

A expressão de EphB4 foi também investigada em tecido humano mamário normal e maligno, e foi descoberto que em tecido normal a expressão dessa proteína é limitada às células epiteliais secretoras, e uma elevada expressão em várias linhagens celulares de carcinoma de mama e em carcinoma ductal primário (BERCLAZ *et al.*, 1996).

Câncer de mama

Câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. Sua progressão dá-se a partir do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas em genes reguladores do crescimento e diferenciação celular, como os proto-oncogenes e os genes supressores

de tumor. Estes regulam direta ou indiretamente os mecanismos celulares de controle de proliferação, morte celular e integridade genômica (KVITKO, 2003).

Os proto-oncogenes codificam proteínas que regulam o crescimento e a divisão celular. Quando sofrem mutações transformam-se em oncogenes, que por ter sua função normal alterada, permitem a proliferação celular de forma continuada e independente de estímulos externos. Geralmente, basta que um dos alelos esteja mutado para que o fenótipo neoplásico se manifeste (BISHOP, 1991; AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

Já os genes supressores de tumor regulam negativamente a proliferação das células, exercendo efeito repressivo na regulação do ciclo celular ou induzindo a apoptose. Se ambos os alelos forem inativados, podem desencadear crescimento celular aberrante, contribuindo para o desenvolvimento do tumor (MARX, 1993; AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

Um tumor é considerado maligno quando suas células adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes, e formar tumores secundários em órgãos distantes através de um processo chamado de metástase (LAZEBNIK, 2010).

O câncer de mama é um dos tipos mais frequente de neoplasia, sendo no Brasil o segundo maior responsável pela mortalidade feminina. Cerca de 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. De acordo com a última Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para o ano de 2012, realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA/MS, 2012), o câncer de mama será o segundo mais incidente entre as mulheres, com 52.680 casos, sendo que a maior parte deles é encontrada nas regiões Sudeste (29.360) e Sul (9.350). No Paraná, estima-se uma taxa de 55,83 casos novos para cada 100 mil mulheres.

O câncer de mama ocorre quando células de algumas estruturas mamárias, principalmente dos lóbulos e dos ductos (porção secretora da mama) começam a se dividir de forma anormal e incontrolável, formando uma massa de tecido independente, o tumor (DeFELICE, 2002).

A glândula mamária sofre remodelamento e diferenciação mesmo em mulheres adultas, pois a cada ciclo menstrual passa por ondas sequenciais de proliferação e apoptose, e na gestação sofre ramificação dos ductos e aumento no número de alvéolos (NAVARRETE *et al.*, 2005). Para possibilitar a formação de novas estruturas durante esse constante desenvolvimento sugere-se que existam células tronco epiteliais mamárias, e essas células são um potencial sítio de origem de câncer (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

O prognóstico do câncer de mama é dependente de fatores clínicos e patológicos tais como, existência de metástases em linfonodos axilares, tipo e tamanho do tumor, grau histológico, presença ou ausência de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e amplificação ou hiperexpressão do gene *ERBB2* (BOGLIOLO, 2006). Este gene codifica uma tirosina quinase transmembrana que apresenta certa homologia com receptores de fatores de crescimento epiteliais. Essa proteína atua como receptor celular para um fator de crescimento (CARR *et al.*, 2000). A amplificação ou superexpressão desse gene em pacientes com câncer de mama está associada a um pior prognóstico.

Importantes fatores de risco para o câncer de mama são: história familiar, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade. A idade constitui outro importante fator de risco, havendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade. A menarca precoce (idade da primeira menstruação), a menopausa tardia (após os 50 anos de idade), a ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e a nuliparidade (não ter tido filhos), constituem também fatores de risco para o câncer de mama. A ingestão regular de álcool, mesmo que em quantidade moderada, é identificada como fator de risco para o câncer de mama, assim como a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos (INCA/MS, 2012).

Alterações gênicas

Segundo revisão feita por Feuk *et al.*, 2006a, alteração no número de cópias (CNV – *copy-number variant*) é definida como alteração genômica em que um segmento de DNA, de tamanho aproximado entre 1 kb a 3 Mb, está presente em um número alterado de cópias em comparação à um genoma de referência. Nessas alterações estão inclusas inserções, deleções e duplicações. Pode também ser classificada como variante estrutural submicroscópica.

Esse tipo de alteração pode modificar, por meio de vários mecanismos, a dosagem gênica, o que pode ocasionar a alteração na expressão desse gene. Por exemplo, duplicações podem desencadear um aumento da dosagem que levaria a um aumento na expressão gênica; deleções podem diminuir a dosagem e conseqüentemente diminuir a expressão gênica; deleções na região de elementos regulatórios, como o acentuador, poderiam levar à diminuição da expressão; deleções que modifiquem ou levem à perda da região promotora pode ocasionar uma diminuição

da expressão. A interação desses cenários ou a combinação com outros tipos de alterações também ocorrem, o que poderia justificar características genéticas complexas (FEUK *et al.*, 2006b).

As alterações gênicas são eventos comuns na progressão de diversos tumores sólidos. Integrada a outras análises moleculares, possuem relevância como marcadores de pré-neoplasia, no diagnóstico precoce e ainda na escolha de tratamento (ALBERTSON *et al.*, 2003). Já os perfis de expressão gênica têm sido utilizados na classificação e caracterização molecular de tumores, além da busca de genes associados a características particulares desses tumores. Somado a isso, a expressão gênica se mostra um poderoso preditor na evolução dessa doença (GOLUB *et al.*, 1999; VAN de VIJVER *et al.*, 2002).

Colinesterases e o câncer

Vários estudos mostram a relação da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase no processo de diferenciação, proliferação e adesão celular, na apoptose, bem como no processo de tumorigênese (LAYER, 1991; STEPHENSON *et al.*, 1996; SMALL *et al.*, 1996; BIGBEE *et al.*, 1999). Observa-se também uma alteração estrutural dos genes das colinesterases, ou ainda expressão anormal dessas enzimas em alguns tipos tumorais. Contudo, não se mantém um padrão do comportamento dessas enzimas no tecido canceroso, podendo ter suas atividades aumentadas ou diminuídas dependendo do tipo de tumor, sugerindo que essa variação esteja relacionada com o tipo celular em que o tumor se originou (VIDAL, 2005).

Em câncer de pulmão observa-se que a diminuição da atividade da AChE promove o aumento da concentração da acetilcolina disponível, e isso pode acentuar a sinalização colinérgica e aumentar a proliferação celular, contribuindo com a progressão do tumor (SONG *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-MORENO *et al.*, 2006). A diminuição da atividade da acetilcolinesterase é também observada em câncer de cólon, juntamente com a atividade baixa da butirilcolinesterase (MONTENEGRO *et al.*, 2005).

A atividade dessas enzimas também se encontra alterada em câncer de mama, tendo a AChE uma atividade quase duas vezes maior no tecido tumoral e a BChE diminuída em 65%. Já comparando linfonodos com ou sem metástase, a acetilcolinesterase apresentou uma significativa maior atividade nos linfonodos sem metástase (5,7 vezes) enquanto que a butirilcolinesterase não apresentou alteração. (RUIZ-ESPEJO *et al.* 2002; 2003).

Em tumores do sistema nervoso, observou-se que a quantidade de BChE aumenta conforme aumenta a malignidade do tumor cerebral (BARBOSA *et al.*, 2001), e que a AChE induz a diferenciação morfológica em células de neuroblastoma, indicando uma importância dessa enzima na adesão celular e no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário (JONHSON; MOORE, 2000).

Em relação a alterações estruturais, num estudo feito por Brass *et al.* (1997) todo o braço longo do cromossomo 3 encontra-se amplificado em alguns carcinomas de pulmão de células escamosas. Contudo, em outros tumores desse mesmo estudo, apenas a região 3q26 está amplificada, sendo o gene *BCHE* um dos mais frequentemente alterado.

Estudos mostram ainda uma significativa co-amplificação dos genes *ACHE* e *BCHE* em carcinoma primário de ovário e em células do sangue periférico de pacientes com leucemia (ZAKUT *et al.*, 1990). A co-amplificação desses dois genes relacionados pode estar casualmente envolvida na etiologia de transtornos na formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue (LAPIDOT-LIFSON *et al.*, 1989).

A região na qual está localizado o gene *ACHE* (7q22), por sua vez, também está constantemente envolvida em quebras cromossômicas nas leucemias. Stephenson *et al.* (1996) acreditam que a perda de função do gene *ACHE* aumente a proliferação celular e diminua a maturação de células hematopoiéticas específicas. Além disso, outros autores sugerem ação supressora da acetilcolinesterase na hematopoiese, reduzindo a proliferação de células multipotentes relacionadas com a formação de eritrócitos e megacariócitos, e ainda promovendo a apoptose na sua progênie. Esses achados podem explicar a associação da alteração da expressão do gene *ACHE* com a leucemia (SOREQ *et al.*, 1994).

As regiões dos genes *BCHE* (3q) e *ACHE* (7q) tem sido frequentemente identificadas como amplificadas em tumores mamários (BURDALL *et al.*, 2003). Pinto *et al.* (2006) sugerem que a região 7q seja um potencial sítio candidato para a localização de oncogenes, visto que foi encontrado amplificado com uma certa frequência em carcinomas mamários.

Em trabalho realizado em nosso laboratório, Bernardi *et al* (2010) demonstrou que os genes *ACHE* e *BCHE* encontram-se alterados (amplificados ou deletados) em grande parte das pacientes portadoras de câncer de mama esporádico, estando a deleção em maior número: 54,76% para o gene *BCHE* e 38,10% para o *ACHE*, do que a amplificação: 19,05% e 26,19% para *BCHE* e *ACHE*, respectivamente. Mostrou ainda

que a deleção desses genes está correlacionada com a amplificação do oncogene *ERBB2*, e que conforme aumenta o grau de malignidade do tumor (I, II e III) maior é o número de alterações nesses genes (amplificação + deleção).

Neprilisina e o câncer

Neprilisina tem um papel importante em vários tipos de tumores sólidos, como o de próstata e pulmão, em que parece agir de forma supressora, tendo sua expressão diminuída com a progressão da doença. A NEP regula a proliferação celular de pequenas células cancerosas do pulmão, pois hidrolisa peptídeos semelhantes à bombesina, que são fatores de crescimento dessas células. Ocorrendo quase que exclusivamente em fumantes de cigarro, essas pequenas células cancerosas expressam baixos níveis de NEP na sua superfície, e somando ao fato que a fumaça do cigarro inativa essa enzima, a ação dos peptídeos semelhantes à bombesina é potencializada por essa inibição da NEP, colaborando assim para o desenvolvimento do câncer no pulmão (SHIPP *et al.*, 1991).

Expressa pelas células epiteliais da próstata, a neprilisina atua clivando e inativando neuropeptídeos relacionados com o crescimento de câncer de próstata independente de androgênio. Sua superexpressão inibe o crescimento celular nesse tipo de câncer, contudo, as células metastáticas apresentam uma expressão diminuída. Supõe-se que a diminuição da expressão de NEP é facilitada pela eliminação do androgênio, e que a perda dessa enzima está relacionada com o avanço da doença por permitir que as células cancerosas usem neuropeptídeos mitogênicos como um recurso alternativo ao androgênio para estimular a proliferação celular (PAPANDREOU *et al.*, 1998). Em outro estudo com câncer de próstata, Osman *et al.* (2004) mostraram que a diminuição da expressão da NEP pode contribuir para a progressão do câncer após prostatectomia radical.

Já no linfoma difuso de grandes células B, o mais comum subtipo de linfoma não-Hodgkin, o aumento da expressão de neprilisina está correlacionado com o aumento no índice de apoptose. A neprilisina pode degradar citocinas – moléculas sinalizadoras de efeito protetivo da apoptose em células B. Com a inibição dessa proteção o aumento da expressão da neprilisina pode potencializar a capacidade de apoptose e com isso ter um efeito favorável na evolução clínica (BAI *et al.*, 2003).

No melanoma, a superexpressão da NEP é mais comum em tumor metastático que primário, e isso tem uma forte relação com o aumento da sua transcrição, sugerindo

que o acúmulo da neprilisina na metástase é decorrente do aumento da sua produção, e não ao aumento da meia vida ou diminuição da degradação desta proteína (VELAZQUEZ *et al.*, 2007).

Outras investigações mostraram que a expressão tumor-específica da neprilisina nas células do estroma pode facilitar a invasão e progressão metastática nos carcinomas gástricos, colo-retal e de mama (HUANG *et al.*, 2005; OGAWA *et al.*, 2002; IWAYA *et al.*, 2002).

Células normais mioepiteliais da glândula mamária expressam neprilisina durante seu desenvolvimento e após sua maturação (GUSTERSON *et al.*, 1986). É também encontrada em associação com tumores mamários, sendo expressa em células do estroma em fibroadenoma e tumor filodes (MECHTERSHEIMER *et al.*, 1990), especialmente quando esse último é maligno (TSE *et al.*, 2005).

O papel da neprilisina na glândula mamária e o mecanismo de sua regulação no desenvolvimento das células do estroma, e na associação com o câncer de mama permanecem não explicados até o presente momento. Entre algumas especulações está a sua capacidade de inativar vários peptídeos reguladores, como a ocitocina (STEPHENSON; KENNY, 1987), que possui atividade mitogênica e estimulante na diferenciação das células mioepiteliais (SAPINO *et al.*, 1993).

De acordo com o mostrado por Iwaya *et al.* (2002), a expressão de NEP não foi detectada em células normais do estroma da mama, mas foi encontrada nas células estromais de carcinoma ductal invasivo, e nos casos com presença de metástase no linfonodo a frequência foi muito alta, sugerindo que a expressão de neprilisina pelas células do estroma seja tumor-específico, estando intimamente ligada ao comportamento biológico agressivo, facilitando assim a invasão e a metástase de carcinoma mamário. Dado semelhante foi visto em estudo mais recente, em que a expressão dessa enzima foi maior em células do estroma de carcinoma invasivo quando comparada com carcinoma ductal *in situ*, e ainda foi associada a um maior grau do tumor e diminuição da sobrevida da paciente. (MAKRETSOV *et al.*, 2007).

A questão de como as células do estroma que expressam neprilisina pode aumentar a agressividade do carcinoma de mama ainda não é clara. Acredita-se que essas células podem interagir com as células cancerosas e com isso alterar o ciclo celular e ativar a locomoção celular (IWAYA *et al.*, 2002).

Embora ainda não se tenha esclarecido a relação direta da neprilisina com o câncer de mama, sabe-se que a expressão dessa enzima no estroma mamário tem um

poder de prognóstico da recorrência e agressividade do tumor, e é um potencial objeto de estudo a fim de desenvolver novas terapias.

EphB4 e o câncer

A família Eph de receptor tirosina quinase e seus ligantes apresentam expressão alterada em uma grande variedade de cânceres, incluindo mama, gastrointestinal, melanomas e neuroblastomas, e com diversas consequências na progressão da doença.

Em particular, um membro dessa família, o EphB4, tem sido relacionado ao câncer. Esse receptor é essencial para a morfogênese normal da vascularização do embrião, no entanto, o seu envolvimento na progressão tumoral é sugerido por agir também como angiogênico células de câncer de mama. A formação dessa vascularização se dá por meio da interação entre o ectodomínio de EphB4 nas células tumorais e o seu ligante (efrina B2) nos vasos sanguíneos (NAKAMOTO; BERGEMANN, 2002; NOREN *et al.*, 2004).

Em leucemia linfóide aguda (LLA), a região promotora do gene EPHB4 foi identificada como potencial alvo de hipermetilação, o que resultaria em silenciamento transcricional, e com isso sua expressão está frequentemente reduzida ou perdida nesse tipo de leucemia, sendo essa perda associada a um mau prognóstico. A reintrodução de EphB4 em células deficientes nesse receptor induziu significativamente a apoptose e reduziu o crescimento celular, sugerindo que EphB4 tem atividade supressora de tumor em LLA (KUANG *et al.*, 2010).

Essa atividade supressora de tumor foi também observada em câncer colorretal por Dopeso *et al* (2009). A modulação dos níveis de EphB4 em linhagens celulares desse tipo de câncer resultou em diferenças no crescimento do tumor. Um crescimento mais rápido foi associado a um nível mais baixo desse receptor. A perda de EphB4 nessas células resulta em um significativo aumento do potencial de invasão por meio da matriz celular.

A expressão de EphB4 foi analisada em carcinoma de endométrio e de ovário, e em ambos estudos foi observado um mesmo comportamento, a expressão desse receptor é quase ausente em tecidos normais de endométrio e ovário, mas é altamente expresso nas células tumorais desses tecidos (BERCLAZ *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2006). Esse mesmo comportamento foi mostrado por Xia *et al.* (2005) em estudo com mesotelioma, com uma alta expressão do receptor apenas em linhagens celulares de

mesotelioma e não no tecido normal. Essa alta expressão foi ainda associada a uma maior sobrevivência das células tumorais por favorecer o crescimento descontrolado, a migração e a progressão do tumor.

No câncer de mama, o receptor EphB4 pode desempenhar atividade tanto promotora quanto supressora de tumor. Esse comportamento contraditório nos permite acreditar que o contexto celular parece também desenvolver um papel importante na determinação do efeito promotor/supressor (NOREN; PASQUALE, 2004).

EphB4 participa do desenvolvimento anormal do epitélio mamário por estar envolvido na regulação da arquitetura do tecido e na resposta ao crescimento celular. Sua expressão elevada provoca aumento do potencial angiogênico, pelo estímulo reverso da sinalização da efrina-B2, de células mamárias e facilita a invasão tumoral (BERCLAZ *et al.*, 1996; MUNARINI *et al.*, 2001). Essa expressão alterada pode também ser impulsionada por amplificação gênica e prevê vantagens de sobrevivência às células tumorais por atenuar as vias de morte celular e regular as proteínas anti-apoptóticas (KUMAR *et al.*, 2006)

Contudo, EphB4 pode desempenhar uma atividade supressora, inibindo a tumorigenicidade de células cancerosas, um comportamento não muito usual para a família de receptores de tirosina quinase. Em células de câncer de mama, EphB4 ativa uma via antioncogênica envolvendo a família Abl de tirosina quinase e a proteína adaptadora Crk. Essa via Abl-Crk inibe a viabilidade e proliferação de células cancerosas. EphB4 e a via Abl-Crk estão constitutivamente ativos em células epiteliais mamárias não transformadas, e esse seria importante alvo de intervenção terapêutica ativando a sinalização de EphB4 para inibir a progressão do tumor (NOREN *et al.*, 2006).

O complexo papel desempenhado pelo receptor EphB4 em câncer está ainda por ser melhor elucidado pois envolve questões confusas e controversas devido sua participação ora como supressor ora como promotor de tumor (NOREN; PASQUALE, 2007), e novas descobertas sobre sua participação na tumorigênese são necessárias.

OBJETIVO

Objetivo geral

Verificar se existem alterações no número de cópias e na expressão dos genes *ACHE*, *BCHE*, *EPHB4* e *MME* em tecido tumoral e não tumoral de mama.

Objetivos específicos

Determinar se as alterações no número de cópias (amplificação ou deleção) são semelhantes entre os genes localizados proximalmente (*ACHE* - *EPHB4*) e (*BCHE* - *MME*).

Traçar um perfil de expressão desses genes no tecido tumoral e não tumoral.

Averiguar semelhanças e diferenças do padrão de expressão desses genes nos dois tecidos.

Verificar correlações entre a expressão de cada um desses genes com suas respectivas alterações no número de cópias.

Buscar associações das alterações no número de cópias e da expressão com parâmetros histopatológicos.

JUSTIFICATIVA

Em trabalho anterior de nosso laboratório foi verificado que os genes *BCHE* e *ACHE* estavam alterados estruturalmente na maior parte dos casos de câncer de mama analisados. Uma análise de genes que estão localizados próximos aos genes já estudados (*ACHE* e *BCHE*) e que possuem alguma relação ao desenvolvimento do câncer, pode indicar se essas alterações afetam apenas esses genes ou uma região maior do cromossomo. Por isso foram incluídos a esse estudo os genes *EPHB4*, que está a uma distância de 62.5 Kb do gene *ACHE*, e o gene *MME* que se encontra a 10.6 Mb de distância do gene *BCHE*. Para complementar o estudo de alterações nessas regiões em amostras de carcinoma mamário, foram feitas análises da expressão gênica, que também irão contribuir para o entendimento sobre a participação desses genes no processo de tumorigênese.

CAPÍTULO I

**Copy number variation in *ACHE / EPHB4* (7q22) and in *BCHE / MME* (3q26) genes
in sporadic breast cancer**



Copy number variation in *ACHE/EPHB4* (7q22) and in *BCHE/MME* (3q26) genes in sporadic breast cancer

Dellyana R. Boberg^a, Meire S. Batistela^a, Micheli Pecharki^a, Enilze M.S.F. Ribeiro^a, Igenir J. Cavalli^a, Rubens S. Lima^b, Cícero A. Urban^b, Lupe Furtado-Alle^a, Ricardo L.R. Souza^{a,*}

^aGenetic Department, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^bBreast Unit, Nossa Senhora das Graças Hospital, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxxxx

Keywords:

Copy number variation
Breast cancer
Chromosome region 7q22 and 3q26
Acetylcholinesterase
Butyrylcholinesterase

ABSTRACT

Gene amplifications and deletions are common changes in human cancer cells. Previous studies indicate that the regions, where the *ACHE* (7q22) and *BCHE* (3q26.1–q26.2) genes are localized, are suffering such structural modifications in breast cancer. Therefore, the products of these genes, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, respectively, are related to the process of cell differentiation and proliferation, as well as apoptosis. This study also included two other genes involved in tumorigenesis, the *EPHB4* (7q22.1) and *MME* (3q21–27). The aim of this study was to verify amplification and/or deletion in the *ACHE*, *BCHE*, *EPHB4* and *MME* genes in 32 samples of sporadic breast cancer. The gene alterations were detected using real-time PCR and determined by relative quantification with the standard curve method. All samples presented genetic alterations, showing a higher tendency for amplification of the *ACHE* (62.5% vs. 37.5%; $p > 0.1$) and *EPHB4* (53.13% vs. 46.88%; $p > 0.5$) genes, and for deletion of the *BCHE* and *MME* genes (56.25% vs. 43.75% for both; $p > 0.5$). A positive correlation was found between alterations in *ACHE*–*EPHB4* and *BCHE*–*MME* pairs ($r_s = 0.5048$; $p = 0.0004$; $r_s = 0.3581$; $p = 0.0478$, respectively) indicating that these changes comprise a wide region. In conclusion, the results suggest that these genomic regions may contain important genes for this pathology, such as the oncogenes *MET* (7q31) and *MNCA* (3q28), and thus being interesting targets for future studies in breast cancer research.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Structural genomic alterations such as gene amplifications and deletions commonly contribute to development and progression of tumors. During oncogenesis, these changes occur from successive chromosomal aberrations that lead to gains or losses of parts of the genome of the tumor cells, causing aberrant function of genes that regulate negatively and positively the cell proliferation, apoptosis, genomic stability, angiogenesis, invasion and metastasis [1,2]. The identification of chromosome regions suffering such alterations as well as the role of genes within these regions is important in cancer research [3,4].

ACHE and *BCHE* genes chromosome regions (7q22 and 3q26.1–q26.2, respectively) are frequently altered in different types of cancer, such as leukemia [5], lung [6], head and neck [7], lymphoma [8] and breast [9]. In a previous study, *ACHE* and *BCHE* genes were found altered (amplified or deleted) in most sporadic breast cancer patients [10].

The products of these genes are, respectively, acetylcholinesterase (*ACHE*) and butyrylcholinesterase (*BCHE*) which, besides hydro-

lyzing choline esters, also have a non-cholinergic activity related to cell growth. During neural system development, both *ACHE* and *BCHE* participate in cell differentiation and proliferation [11]. By regulating multipotent stem cell proliferation *ACHE* has a role in haematopoiesis, and also in apoptosis in cells undergoing erythroid and myeloid differentiation [5]. Considering the non-cholinergic activities of *ACHE* and *BCHE* there is evidence that both have a role in tumorigenesis [12].

The aim of the present study was to investigate if the copy number variation found in sporadic breast cancer patients is restricted to *ACHE* and *BCHE* genes or if it affects a larger chromosome region. To accomplish that, we included in the study the *EPHB4* (7q22.1) and *MME* (3q21–27) genes, which products (receptor *EphB4* and neprilysin, respectively), are altered in prostate cancer [13], non-Hodgkin's lymphoma [14], endometrium/ovary cancer [15] and breast cancer [16,17].

2. Material and methods

2.1. Samples

This study used samples of breast carcinoma and peripheral blood from 32 patients from Hospital Nossa Senhora das Graças

* Corresponding author.

E-mail address: ricardo.lrb@ufpr.br (R.L.R. Souza).

and Hospital de Clínicas, both from Curitiba/Brazil. The tumors were classified histopathologically according to World Health Organization Classification of Tumours. The most frequent histological type found was invasive ductal carcinoma (79.3%), followed by lobular carcinoma (10.9%) and tubular carcinoma (3.5%). Invasive papillary carcinoma and poorly differentiated carcinoma account together for 6.9% of histological types. The mean age of the patients was 58 ± 16.5 years. The Institutional Ethics Committee approved the study. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. DNA Analysis

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by a salting-out method [18] and by phenol–chloroform from tumor tissue [19]. Samples were diluted to 20 ng/ μ l final concentration of DNA.

Genomic alterations were identified using real-time PCR (TaqMan[®] probes). Each reaction was conducted as follows: 5 μ l of Master Mix Quantifast[®] Probe PCR; 2 μ l of genomic DNA; 0.5 μ l of Prime Time[®] qPCR Assay and 2.5 μ l of ultrapure water. Besides the four target genes (ACHE, BCHE, EPHB4 and MME), RNA 18S ribosomal 1 (18S), homolog of Pumilio, *Drosophila*, 1 (RUM1) and β -actin (ACTB) were used as endogenous control genes by having levels of amplification and expression in tumor tissues unchanged [20,21]. All the reactions were performed in three replicates for quality control.

Relative quantities were obtained using the standard curve method, which compares patient sample results with data obtained from a standard curve (dilution factor 4). Standard dilution series were as follows: 256; 64; 16; 4 and 1 ng/ μ l. Mastercycler[®]

ep realplex (Eppendorf) and Realplex 1.5 Eppendorf Software were used to determine sample concentrations (ng/ μ l).

2.3. Statistical analysis

For each sample, a ratio (Q) was calculated between the mean amounts of target and reference genes in the tumor and in peripheral blood [22,10].

To determine the type of change (amplification or deletion) of the genes for each sample it was calculated an average of the Q values and an average of the standard deviation (SD) values using two reference genes with consistent results. If mean Q \pm mean S.D. > 1, the samples are amplified. If mean Q \pm mean S.D. < 1, the samples are deleted (using a 95% confidence interval). Spearman correlation and logistic regression test between the results obtained and the clinical histopathological data were accomplished using Bioestat 5.0.

3. Results and discussion

All patient samples showed gene amplifications or deletions (Table 1). It was observed a tendency for amplification of the ACHE (62.5% vs. 37.5%; $p > 0.1$) and the EPHB4 (53.13% vs. 46.88%; $p > 0.5$) genes and for deletions of the BCHE (56.25% vs. 43.75%; $p > 0.5$) and the MME (56.25% vs. 43.75%; $p > 0.5$) genes (Fig. 1). Positive correlations were found between alterations of the ACHE and the EPHB4 genes ($r_s = 0.5948$; $p = 0.0004$) and between the BCHE and the MME genes ($r_s = 0.3581$; $p = 0.0478$).

In this study, the investigation of changes in the copy number of the ACHE and BCHE gene regions showed results consistent with

Table 1
Relative amount (Q) of ACHE, EPHB4, BCHE and MME genes and Standard Deviation (S.D.) in 32 patients with sporadic breast cancer, grouped according to the alterations obtained.

Case	Histological type	ACHE $Q_{(mean)} \pm S.D._{(mean)}$	Alt	EPHB4 $Q_{(mean)} \pm S.D._{(mean)}$	Alt	BCHE $Q_{(mean)} \pm S.D._{(mean)}$	Alt	MME $Q_{(mean)} \pm S.D._{(mean)}$	Alt
4	NI	1.14 \pm 0.003	A	1.60 \pm 0.003	A	1.13 \pm 0.002	A	1.38 \pm 0.002	A
5	DC	2.01 \pm 0.020	A	1.87 \pm 0.003	A	1.23 \pm 0.003	A	1.88 \pm 0.012	A
13	DC	1.43 \pm 0.011	A	1.55 \pm 0.011	A	1.27 \pm 0.001	A	1.15 \pm 0.001	A
22	DC	1.18 \pm 0.018	A	1.41 \pm 0.020	A	1.23 \pm 0.019	A	1.06 \pm 0.017	A
3	DC	0.68 \pm 0.002	D	0.61 \pm 0.002	D	0.75 \pm 0.001	D	0.74 \pm 0.001	D
14	DC	0.40 \pm 0.004	D	0.88 \pm 0.001	D	0.82 \pm 0.001	D	0.77 \pm 0.002	D
16	DC	0.69 \pm 0.005	D	0.72 \pm 0.001	D	0.67 \pm 0.001	D	0.47 \pm 0.001	D
18	DC	0.36 \pm 0.003	D	0.40 \pm 0.002	D	0.56 \pm 0.002	D	0.45 \pm 0.002	D
28	DC	0.35 \pm 0.016	D	0.73 \pm 0.015	D	0.68 \pm 0.022	D	0.57 \pm 0.012	D
6	DC	1.94 \pm 0.019	A	1.44 \pm 0.013	A	0.80 \pm 0.009	D	0.84 \pm 0.010	D
10	DC	3.03 \pm 0.122	A	2.39 \pm 0.051	A	0.82 \pm 0.001	D	0.90 \pm 0.002	D
12	DC/IC	1.61 \pm 0.004	A	1.96 \pm 0.005	A	0.54 \pm 0.001	D	0.80 \pm 0.005	D
25	DC	3.68 \pm 0.030	A	3.41 \pm 0.021	A	0.59 \pm 0.013	D	0.68 \pm 0.016	D
26	DC	1.79 \pm 0.029	A	1.94 \pm 0.051	A	0.59 \pm 0.010	D	0.72 \pm 0.012	D
9	IC	0.74 \pm 0.002	D	0.75 \pm 0.003	D	1.68 \pm 0.005	A	1.65 \pm 0.002	A
17	DC	0.79 \pm 0.003	D	0.83 \pm 0.009	D	1.30 \pm 0.006	A	1.15 \pm 0.006	A
1	PC	1.28 \pm 0.013	A	0.86 \pm 0.001	D	1.34 \pm 0.002	A	1.38 \pm 0.002	A
2	PO	2.43 \pm 0.079	A	0.55 \pm 0.022	D	1.50 \pm 0.097	A	2.39 \pm 0.073	A
27	DC	0.56 \pm 0.006	D	1.63 \pm 0.016	A	2.55 \pm 0.025	A	2.03 \pm 0.020	A
24	DC	0.68 \pm 0.009	D	1.87 \pm 0.004	A	1.85 \pm 0.004	A	1.44 \pm 0.002	A
8	DC	1.33 \pm 0.003	A	0.55 \pm 0.001	D	0.59 \pm 0.003	D	0.62 \pm 0.002	D
11	IC	0.87 \pm 0.021	D	1.52 \pm 0.022	A	0.56 \pm 0.004	D	0.80 \pm 0.012	D
20	DC	1.15 \pm 0.023	A	0.85 \pm 0.027	D	0.85 \pm 0.027	D	0.76 \pm 0.015	D
23	NI	2.88 \pm 0.015	A	0.78 \pm 0.004	D	0.78 \pm 0.005	D	0.78 \pm 0.004	D
7	NI	1.45 \pm 0.003	A	1.84 \pm 0.003	A	0.68 \pm 0.001	D	1.67 \pm 0.002	A
15	DC	3.06 \pm 0.004	A	1.98 \pm 0.003	A	0.55 \pm 0.001	D	1.46 \pm 0.009	A
19	DC	4.68 \pm 0.085	A	2.45 \pm 0.049	A	1.67 \pm 0.033	A	0.61 \pm 0.012	D
29	DC	1.25 \pm 0.031	A	1.07 \pm 0.050	A	1.86 \pm 0.026	A	0.83 \pm 0.021	D
32	DC/IC	1.44 \pm 0.051	A	1.26 \pm 0.041	A	7.68 \pm 0.261	A	0.67 \pm 0.030	D
30	DC	0.70 \pm 0.005	D	0.65 \pm 0.004	D	0.69 \pm 0.003	D	1.14 \pm 0.008	A
31	NI	0.28 \pm 0.001	D	0.33 \pm 0.002	D	4.68 \pm 0.019	A	0.51 \pm 0.003	D
21	TC	1.13 \pm 0.001	A	0.49 \pm 0.001	D	0.68 \pm 0.001	D	1.63 \pm 0.001	A

Abbreviations: Alt – alteration; D – deletion; A – amplification; DC – invasive ductal carcinoma; IC – lobular carcinoma; TC – tubular carcinoma; PC – invasive papillary carcinoma; PO – poorly differentiated carcinoma; NI – no information.
Values in bold indicate alterations are not consistent within groups ACHE–EPHB4 and BCHE–MME.

Please cite this article in press as: D.R. Baberg et al., Copy number variation in ACHE/EPHB4 (7q22) and in BCHE/MME (3q26) genes in sporadic breast cancer, Chemico-Biological Interactions (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.020>

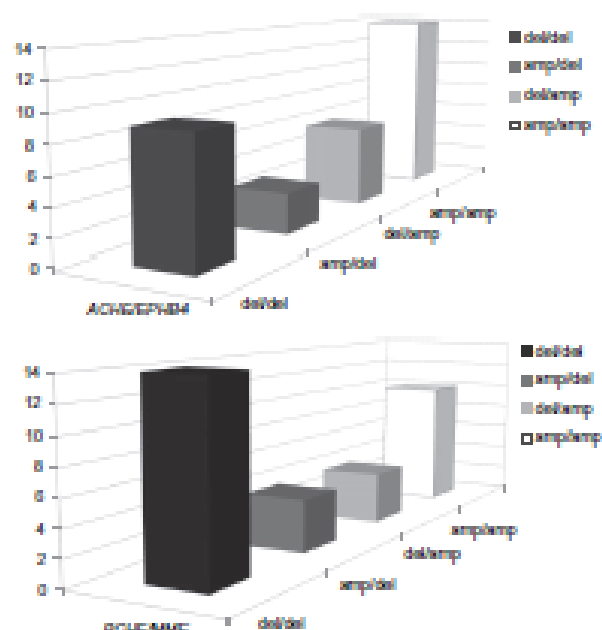


Fig. 1. Alterations presented by genes *ACHE*, *EPHB4*, *BCHE* and *MME*. It was observed a trend to greater amplification (amp) in pair *ACHE*–*EPHB4* and deletion (del) in the *BCHE*–*MME* pair. The order of alterations (del/del); amp/del; del/amp; amp/amp follow the same order of the genes (*ACHE*/*EPHB4*; *BCHE*/*MME*).

other studies of gains and losses of chromosomal regions. Lu et al. [23], analyzing structural alterations in pheochromocytoma, noted a frequent 7q gain and 3q loss, suggesting some pathogenic similarity with breast carcinoma. It is also concordant with the altered behavior of cholinesterases activity in breast cancer: one study showed a statistically significant increase (twice) of *ACHE* and decrease of 65% of *BCHE* activity [24].

Amplification of chromosome 7 is among the most frequent cytogenetic abnormalities found in breast carcinoma. Fozzani et al. [25] studying 11 breast cancer cell lines noted that two third of the sites of amplifications was performed in loci not associated with already established oncogenes, such as 7q21–q22, reinforcing the hypothesis that this region may harbor candidate oncogenes [26,27]. Next to this region is located a proto oncogene, *MET* (7q31), that encodes a growth factor receptor and is associated with protein kinases of other oncogenes [28]. Its signaling can promote unregulated cell proliferation in normal mammary gland, a necessary event in maintaining the functional and phenotypic properties of tumors [29].

Based on the fact that the high expression of *EphB4*, resulting from gene amplification, causes an increase in angiogenic potential of breast cells and facilitates tumor invasion [16,30,31], regression tests were performed to verify if *EPHB4* gene alterations are independent risk factors for the process of metastasis, but none of the results were statistically significant ($p > 0.05$).

Deletions in the long arm of chromosome 3 appear to be late events in the breast cancer progression because allelic losses or imbalances affecting these areas were rarely observed in its *in situ* ductal carcinoma, and were more frequent in invasive stage and lymph node metastases [32,33]. The expression of neprilysin in invasive ductal carcinoma is closely linked to an aggressive biological behavior, thus facilitating the invasion and metastasis of mammary carcinoma [34].

Such studies corroborate the trend to higher deletions of *MME* gene, as obtained in this work, however the logistic regression test

with lymph node metastasis (as independent variable) and alterations of *MME* gene were not statistically significant ($p > 0.05$).

Despite the many indications of the involvement of *BCHE* and neprilysin in oncogenesis, the structural changes may have occurred accidentally by the proximity of these genes to known proto oncogenes.

One of the most studied is the *PIK3CA*, that encodes a subunit of *PI3K* (phosphatidylinositol 3-kinase) an enzyme that participates in the regulation of cell proliferation, adhesion and motility, mainly by mediating the signaling of the epidermal growth factor. Changes in the components of the *PI3K* pathway are common in breast cancer [35,36].

It is possible to infer that the amplifications and deletions revealed here cover a much larger area than just the genes *ACHE* and *BCHE*, and even though the cholinesterases, as well as the receptor *EphB4* and neprilysin exert some influence on tumorigenesis, we cannot say that there is a direct causal relationship of these proteins in tumor development. The copy number variation of these genes can be seen as a consequence of the neoplastic process, which somehow could be advantageous to disease progression.

Conflict of interest

The author declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

Grants were received from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Araucária Foundation and Scholarships from Coordination for Improvement of Higher Education (CAPES).

References

- [1] D.G. Albertson, C. Collins, F. McCormick, J.W. Gray, Chromosome aberrations in solid tumors, *Nat. Genet.* 34 (2002) 369–376.
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57–70.
- [3] T. Ried, K. Hentzenberger-Haddad, H. Blieger, E. Schröck, C. Auer, Genomic changes defining the genetic progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation, *Cancer Chromosomes Cancer* 25 (1999) 195–204.
- [4] S. Kuznetsov, A.M. Bjorkqvist, K. Aulisio, M. Tarkkanen, M. Wolf, O. Monni, J. Szymanski, M.L. Laramendy, J. Tapper, H. Peto, W. El-Sifa, S. Hemmer, V.M. Wazemita, V. Widgren, Y. Zhu, DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies, *Am. J. Pathol.* 152 (1998) 1107–1123.
- [5] J. Stephenson, B. Cepulakowski, W. Hirt, C.J. Mills, Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), *Leuk. Res.* 20 (1995) 235–241.
- [6] K. Brax, A. Racz, D. Hecker, K. Remberger, C.W. Szyrchel, E.J. Menez, Amplification of the genes *BCHE* and *SLC22A2* in 40% of squamous cell carcinoma of the lung, *Cancer Res.* 57 (1997) 2290–2294.
- [7] K. Hibi, B. Trink, M. Patrunjan, W.H. Westra, G.L. Caballero, D.E. Hill, E.A. Rabinovitch, J. Jin, D. Sidransky, *AS1* is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 5462–5467.
- [8] C. Robledo, J.L. García, R. Benito, T. Flores, M. Mollayo, J.A. Martínez-Clement, E. García, N.C. Gutiérrez, M.A. Piris, J.M. Hernández, Molecular characterization of the region 7q22.1 in splenic marginal zone lymphomas, *BMC ONE* 5 (2011) e24939.
- [9] S.E. Bundred, A.M. Hanby, M.R. Laxton, V. Speirs, Breast cancer cell lines: friend or foe?, *Breast Cancer Res.* 5 (2003) 89–95.
- [10] C.C. Bernardi, E. Ribeiro, I.J. Cavali, E.A. Chastard-Beim-Mais, R.L.R. Souza, Amplification and deletion of the *ACHE* and *BCHE* cholinesterase genes in sporadic breast cancer, *Cancer Genet. Cytogenet.* 197 (2010) 158–165.
- [11] P.G. Layer, Cholinesterases during development of the avian nervous system, *Cell. Mol. Neurobiol.* 11 (1991) 7–22.
- [12] D.H. Small, S. Michaelson, G. Sberna, Non-classical actions of cholinesterase: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 28 (1996) 453–463.
- [13] C.N. Papadopoulos, B.A. Urmann, Y. Gong, T. Bogrenskider, R. Parnian, S. Wolk, C.L. Fritstad, V.E. Reuter, C.T. Powell, D. Scheinberg, Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression, *Nat. Med.* 4 (1998) 50–57.

- [14] M. Bai, N.J. Aguntz, A. Skytar, E. Tzanou, S. Karina, V. Galani, P. Karavatos, Increased expression of the bcl-2 and CD10 protein is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas, *Mod. Pathol.* 16 (2003) 471–480.
- [15] G. Barclay, E. Karamitopoulou, L. Mazzucchelli, V. Rohrbach, E. Dostler, A. Ziemiecki, A.C. Andres, Activation of the receptor protein tyrosine kinase EphA2 in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma, *Ann Oncol.* 14 (2003) 220–226.
- [16] S.R. Kumar, J. Singh, C. Xia, V. Khramov, L. Hassanli, E.J. Ley, J. Schmitt, N.C. Kumar, D. Hawes, M.P. Press, F.A. Weaver, P.S. Gill, Receptor tyrosine kinase EphA2 is a survival factor in breast cancer, *Am. J. Pathol.* 69 (2006) 279–293.
- [17] N.A. Malestrov, M. Hayes, B.A. Carter, S. Dabiri, C.B. Gilio, D.G. Huntsman, Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade, *Mod. Pathol.* 20 (2007) 84–89.
- [18] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [19] D. Signon, M.A. Fernandez-Villa, *Protocols of the 12th International Histocompatibility workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP)* in: D. Chouron (Ed.), *Genetic Diversity of HLA: Functional and Medical Implication*, Serono, EDK, Paris, 1997, pp. 584–595.
- [20] T.D. Schmittgen, B.A. Livak, Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR, *J. Biochem. Biophys. Methods* 46 (2000) 69–81.
- [21] M.B. Iyng Av, Lenn Khohn, N. Pallgaard, H. Ditzel, Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinoma, *BMC Cancer* 22 (2008) 9–20.
- [22] M. Könighoff, J. Wilhelm, R.M. Böhm, A. Ringold, M. Hahn, HER-2/neu gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue, *Clin. Chem.* 49 (2003) 219–229.
- [23] Y.J. Lu, S. Birdall, P. Ota, B. Gusterson, J. Shipley, Phyllodes tumor of the breast analyzed by comparative genomic hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence, *Genes Chromosomes Cancer* 20 (1997) 275–281.
- [24] E. Ruiz-Espejo, J. Cabezas-Herrera, J. Hana, F.J. Campoy, C.J. Vidal, Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 72 (2002) (2002) 11–22.
- [25] F. Brozian, E. Vridman, C.A. Ammerman, N.Z. Pama, A. Kallioniemi, O.P. Kallioniemi, S.P. Ethier, Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines, *Br. J. Cancer* 81 (1999) 1328–1334.
- [26] Y.J. Lu, S. Xiana, Y.S. Yanh, S.B. Pua, Q.Z. L.P. Liu, Direct chromosome analysis of 50 primary breast carcinomas, *Cancer Genet. Cytogenet.* 69 (1993) 91–98.
- [27] I. Blicha, A. Khodja, K. Erikach, R. Lidrans, Genetic alteration mapping on chromosome 7 in primary breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 1009–1016.
- [28] M. Dean, M. Park, M.M. Le Beau, T.S. Robins, M.O. Diaz, J.D. Rowley, D.C. Blair, C.F. Vande Woude, The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes, *Nature* 318 (1985) 385–388.
- [29] S. Cantaldi, E. Sant, B. Accornero, D. Torti, E. Calini, G. Migliardi, G. Molyneux, T. Perina, P.M. Comoglio, C. Roccaro, M.J. Smalley, A. Bertotti, L. Trastullo, Met signaling regulates growth, repopulating potential and basal cell-like commitment of mammary luminal progenitors: implications for basal-like breast cancer, *Oncogene* (2012), <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.154>.
- [30] G. Berdas, A.C. Andres, D. Albrecht, E. Dostler, A. Ziemiecki, B.A. Gusterson, M.B. Crompton, Expression of the receptor protein tyrosine kinase *myk-1/hk* in normal and malignant mammary epithelium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226 (1996) 969–975.
- [31] N. Munarini, E. Bjer, S. Alderhalden, C. Zamber, V. Rohrbach, S. Lomcher, B. Pfanner-Meyer, A.C. Andres, A. Ziemiecki, Altered mammary epithelial development, pattern formation and invasion in transgenic mice expressing the EphA2 receptor tyrosine kinase, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 25–37.
- [32] C.M. Aldat, T. Chen, A. Sahin, J. Cunningham, M. Bondy, Comparative allelotyping of *in situ* and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinoma, *Cancer Res.* 55 (1995) 3976–3981.
- [33] M. Aubele, A. Mattia, H. Zitzelsberger, A. Walch, M. Kramer, G. Weid, H. Höfler, M. Werner, Extensive ductal carcinoma *in situ* with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by cgh, *Int. J. Cancer* 85 (2000) 82–85.
- [34] K. Iwaya, H. Ogawa, M. Iizumi, M. Kuwada, K. Mukai, Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome, *Vitrovo Arch.* 440 (2002) 589–593.
- [35] L. Shayesteh, Y. Lu, W.L. Kuo, R. Baldocchi, T. Godfrey, C. Collins, D. Pinkel, B. Powell, C.B. Mills, J.W. Gray, P107CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer, *Nat. Genet.* 21 (1999) 99–102.
- [36] R.L. Dillon, D.E. White, W.J. Muller, The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer, *Oncogene* 26 (2007) 1338–1345.

CAPÍTULO II

Análise da expressão dos genes *ACHE*, *BCHE*, *EPHB4* e *MME* em carcinoma mamário.

**Dellyana R. Boberg¹, Meire S. Batistela¹, Rodrigo Aluizio¹, Enilze M. S. F. Ribeiro¹,
Iglénir J. Cavalli¹, Rubens S. Lima², Cícero A. Urban², Lupe Furtado-Alle¹,
Ricardo L. R. Souza¹**

¹*Genetics Department, Federal University of Paraná, Curitiba, PR Brazil*

²*Breast Unit, Nossa Senhora das Graças Hospital, Curitiba, PR, Brazil*

Corresponding author: Ricardo L.R. Souza

email: ricardo.lehtonen@gmail.com

Resumo

Os produtos dos genes *ACHE* e *EPHB4* (7q22); *BCHE* e *MME* (3q26) desenvolvem ações frequentemente relacionadas com processos tumorigênicos como a regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular. Complementarmente, a acetilcolinesterase, o receptor de efrina B4, a butirilcolinesterase e a neprilisina, tem sido descritos com expressão alterada em diversos tipos de câncer. Esse estudo tem como objetivo descrever um perfil de expressão desses genes e relacioná-los com informações histopatológicas das pacientes. Para isso foi feita análise por RT-qPCR em 45 amostras de carcinomas mamários esporádicos e 8 amostras de tecido normal da mama. A quantificação relativa foi realizada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. No carcinoma mamário os genes *BCHE* e *MME* encontram-se significativamente menos expressos (95,6% vs 4,44% $p < 0,001$; em ambos) e os genes *ACHE* e *EPHB4* possuem quantidades semelhantes de amostras menos expressas e mais expressas (57,8% vs 37,8% $p = 0,170$; 42,2% vs 46,4% $p=0,752$, respectivamente. Nenhuma correlação foi encontrada entre expressão e os parâmetros histopatológicos. Comparando as médias de expressão no tecido tumoral e não tumoral, novamente os genes *BCHE* e *MME* possuem uma expressão muito abaixo no tumor em relação à mama normal, e essa diferença não é encontrada nos genes *ACHE* e *EPHB4*. A região 3q26 foi relatada em estudo de alteração do número de cópias como tendendo a estar deletada em câncer de mama esporádico. Mesmo a expressão mais baixa de *BCHE* e *MME* no tumor não ter correlação com as alterações estruturais, sugere-se que esse evento possa contribuir com a instabilidade genômica em toda a região, que somado à outros fatores, e possa influenciar na regulação da expressão desses genes. Os genes *ACHE* e *EPHB4* não apresentaram diferenças no perfil de expressão no carcinoma mamário, nem entre o câncer e as amostras de mama normal, sugerindo que a expressão desses genes é um fator não influenciado pela tumorigênese.

Palavras-chave: expressão gênica relativa, câncer de mama, ACHE, BCHE, EPHB4, MME.

Introdução

Na pesquisa de câncer, têm surgido muitos estudos aliando a busca de um perfil de expressão gênica com a resposta clínica, pois uma classificação molecular pode ser

determinante no andamento do tratamento, acelerando descobertas sobre a biologia do câncer e a identificação de possíveis alvos terapêuticos [1].

Os genes *ACHE* e *BCHE* (7q22 e 3q26.1-26.2) codificam a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase respectivamente, que são elementos fundamentais na neurotransmissão colinérgica. Mas, essas colinesterases possuem também uma atividade não clássica, com funções no processo de diferenciação celular, regulação da proliferação celular e apoptose [2-5].

Esses genes encontram-se amplificados, mutado e/ou expressos de forma aberrante em uma grande variedade de tumores humanos, sugerindo que a sinalização colinérgica pode ser funcionalmente importante no crescimento celular anormal [6]. Estudos com linhagens celulares tumorais de pele, pulmão, cérebro, rim e próstata apontam um comum perfil de expressão elevada do gene *BCHE*. [7-12]. Já o gene *ACHE* está pouco expresso em câncer de intestino e sua superexpressão em tumores cerebrais foi correlacionada com a agressividade do tumor [13, 14].

O receptor de efrina tipo B4, codificado pelo gene *EPHB4* (7q22.1), faz parte da maior subfamília dos receptores de tirosina quinase, que são uma importante classe de proteínas de transdução de sinais, modulam o crescimento e a diferenciação celular, além de participarem da formação dos vasos sanguíneos agem também como angiogênico em tumores. Frequentemente estão superexpressos em uma grande variedade de cânceres, incluindo gastrointestinal, melanomas e neuroblastomas. [15, 16]. Em tecido humano mamário normal e maligno foi observado que a expressão no tecido normal é limitada às células epiteliais secretoras, e em várias linhagens celulares deste carcinoma, a expressão é elevada [17].

A neprilisina é uma metaloprotease pertencente à família peptidase M13 [18]. Codificada pelo gene *MME* (3q21-27), está envolvida no processamento e metabolismo de diversos peptídeos, entre eles hormônios, imunorregulatórios e neuropeptídeos. É normalmente expressa em vários tecidos do corpo, como rim, intestino, linfonodos, condrócitos, várias glândulas, células epiteliais, fibroblastos, pulmão, neutrófilos e endotélio vascular [19-21]. Em tumores de pulmão e próstata apresenta expressão diminuída, principalmente em células metastáticas [22-23]. Contrariamente, em melanoma a expressão está aumentada [24].

É expressa em células normais da mama, durante o seu desenvolvimento e após sua maturação [25], mas também em células do estroma tumores mamários especialmente quando maligno [26-27].

O objetivo desse estudo foi formar um perfil de expressão dos genes *ACHE*, *EPHB4*, *BCHE* e *MME*, localizados em regiões já descritas como alteradas estruturalmente em carcinoma mamário [28], e correlacioná-los com parâmetros histopatológicos, a fim de obter mais conhecimento sobre o comportamento dessas unidades no processo de tumorigênese.

Amostra

Este estudo usou amostras de RNA de 45 pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos e 8 amostras de RNA de tecido normal da mama, utilizados como tecido referência, ambos provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba (PR). A média de idade das pacientes era de 57.8 ± 15.9 anos. Quanto ao tipo histológico do tumor, as amostras foram divididas em dois grupos: ductal (75%) e outros (25%), sendo agrupados nesta categoria vários tipos histológicos como misto, lobular, tubular, e outros, observado em poucas pacientes.

Métodos

O RNA foi extraído de fragmentos de tecido normal e tumoral pelo kit *RNeasy*[®] (*Qiagen*). O cDNA foi sintetizado por um kit de transcrição reversa da Applied Biosystems, o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*. Para quantificar os transcritos específicos de cada gene foi realizada qPCR usando *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay* (*Applied Biosystems*). Esses procedimentos foram feitos de acordo com o protocolo do fabricante.

Análises

Para quantificar os níveis de expressão relativa dos genes *ACHE*, *BCHE*, *MME* e *EPHB4*, optou-se pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que compara a quantidade de gene alvo, normalizada pelos genes de referência, com um tecido calibrador [29]. A quantidade de cDNA obtida é apresentada em *x*-vezes (*fold change* - FC) a expressão do gene no tecido tumoral em comparação com o tecido calibrador (normal), indicando quantas vezes esse gene está mais expresso (> 1), inalterado ($= 1$), ou menos expresso (< 1). Como genes de referência foram utilizados: β -actina (*ACTB*), RNA ribossomal 1 (*18S*) e homólogo do pumílio 1 de *Drosophila* (*PUM1*).

Resultados e discussão

A figura 1 apresenta os valores de FC dos quatro genes estudados para as 45 amostras de câncer de mama. Foram feitas análises de regressão entre esses valores de FC e os dados histopatológicos das pacientes – tipo histológico, tamanho e grau do tumor, presença de metástase no linfonodo, e as três categorias de base terapêutica: receptores de estrogênio e progesterona e a amplificação do *HER2* (também chamado de *ERBB2*) – contudo, nenhum resultado foi significativo ($p > 0,05$).

Baixa expressão dos genes *BCHE* e *MME*

Todas as amostras de câncer apresentaram alguma alteração na expressão para esses dois genes, sendo que 43/45 estavam pouco expressas e 2/45 mais expressas (95,6% vs 4,44% $p < 0,001$; em ambos). Diante de um comportamento tão semelhante no perfil de expressão no tumor, era esperada uma correlação positiva entre os valores de FC dos genes *BCHE* e *MME* ($r_s 0,495$; $p = 0,001$).

A fim de verificar se essa baixa expressão é um comportamento comum desses genes na mama normal e no carcinoma, comparamos as médias de FC dessas duas amostras, e vimos que o tecido normal apresenta expressão em torno de 4X mais alta que o tecido tumoral para o gene *BCHE* ($t = 2,852$; $p = 0,021$) e de 6X mais alta para o gene *MME* ($t = 4,543$; $p = 0,002$). Isso indica que a baixa expressão é uma característica do tecido tumoral.

O perfil de baixa expressão mostrado pelo gene *BCHE* nas amostras de carcinoma mamário deste estudo difere um pouco do comportamento observado na literatura para diversos outros tipos de câncer [9, 10, 12]. No entanto, em um estudo de câncer colorretal, Montenegro *et al.*, (2006) [13] descreveu esse mesmo padrão de expressão, quando comparou com tecido de intestino saudável. Além da expressão estar diminuída no câncer, a sua atividade também foi afetada, estando 58% mais baixa.

Diversos estudos compararam a expressão da neprilisina tanto no tecido normal da mama como em alguns tipos e tumores, usando técnicas imuno-histoquímicas, o que possibilita a detecção dessa proteína de forma célula-específica, principalmente nas células mioepiteliais [27, 30, 31]. Ainda de acordo com estes estudos, a neprilisina está presente nos dois tecidos, mas um aumento da sua expressão no tumor está associado a um mau prognóstico, pois é encontrada preferencialmente expressa em carcinoma ductal invasivo, quando comparado com carcinoma ductal in situ, e também mais

expressa em lesões fibroepiteliais malignas em relação ao tumor filodes benigno e fibroadenoma.

O presente estudo formou um perfil de expressão da neprilisina por meio de abordagem diferente, avaliando a quantidade de transcrito do gene *MME* no câncer de mama esporádico bem como no tecido normal.

Contrariamente ao demonstrado pela literatura citada logo acima, nosso resultado indica uma quase totalidade de amostras de câncer com expressão mais baixa e uma média de expressão mais alta no tecido normal.

O trabalho de Kalof *et al.*, 2004 [32] mostra um comportamento semelhante. Foi comparado um gradiente de expressão da neprilisina (0, ausente; 3+, intenso) em lesões malignas e elementos normais da mama (ductos e lóbulos). Todas as 21 amostras de carcinoma invasivo (12 ductais e 9 lobulares) demonstraram ausência de expressão, e todos os elementos normais apresentaram intensa coloração.

Resultado semelhante também foi encontrado em estudo com carcinoma ductal *in situ*. As amostras de tecido normal tinham maior nível de expressão do mRNA, enquanto que no tecido tumoral 2/3 das amostras apresentavam baixa expressão. A expressão diminuída foi ainda associada com maior risco de recidiva da doença [33]. Com isso, pode-se supor que a baixa expressão de *MME* ocorre nos estágios iniciais da progressão do tumor, e se mantém após o surgimento da invasão, visto que em todas as 30 amostras de carcinoma ductal invasivo de nosso estudo, o gene *MME* estava pouco expresso.

Apesar dos resultados ora concordantes ora contraditórios, as análises por meio de RT-qPCR e de técnicas imuno-histoquímicas podem ser complementares no desafio de buscar um padrão de expressão tanto no nível de mRNA quanto de atividade proteica desse possível marcador, possibilitando um melhor entendimento da sua ação no desenvolvimento e na progressão do câncer de mama.

Alterações estruturais com ganho e perda de número de cópias envolvendo a região 3q26 é um evento frequente e inicial em alguns tipos de câncer, incluindo próstata [34]; nasofaringe [35]; cérvix, ovário e pulmão [36]; carcinoma de células escamosas de esôfago, boca e cabeça e pescoço [37-40]. Esses estudos ainda sugerem que essa região pode conter supostos oncogenes com influência no desenvolvimento e progressão de tumores sólidos, entre eles *PIK3CA* (subunidade catalítica da fosfatidilinositol-3-quinase); *ZASC1* (fator de transcrição dedo de zinco semelhante a Kruppel); *SnoN* (nova proteína N relacionada a Ski) e *IL12A* (subunidade alfa da interleucina-12).

No tocante ao câncer de mama, foram demonstrados eventos de ampliações e deleções que abrangem todo o braço longo do cromossomo 3, sem especificar uma região atingida [41-44]. Em estudo anterior de nosso laboratório, vimos que essa região possui uma tendência a estar deletada em amostras de câncer de mama esporádico (56,25%) [28].

Para ver se existe relação direta entre as deleções e a baixa expressão, foi feita para cada gene uma correlação (Spearman) entre o FC e os valores referentes à alteração estrutural (valor de Q) (dados não mostrados). Essa análise foi possível somente para um subgrupo de 25 amostras inclusas nos dois estudos. Contudo, nenhum valor significativo foi obtido.

O fato de não haver correlação entre a alteração do número de cópias e alteração na expressão nos permite afirmar que a expressão mais alta ou baixa não reflete o maior ou menor número de transcritos e que esses genes são ativados de modo independente de sua amplificação/deleção. Mas, é possível imaginar que essas alterações estruturais contribuam com a instabilidade genômica comumente encontrada nos tumores. E que o somatório desses eventos possa, de alguma forma, estar suprimindo a expressão desses dois genes.

Considerando a extensão de 10Mb entre *BCHE* e *MME*, e a forte correlação entre o perfil de expressão de ambos, seria plausível que toda a região estivesse sofrendo a influência de um mesmo mecanismo de regulação da expressão. Contudo, não há registros na literatura acerca de um mecanismo que pudesse regular expressão de toda essa extensão.

Existem alguns relatos de diferentes padrões de metilação da região promotora do gene *MME*. Em amostras de cirrose com e sem carcinoma hepatocelular foi encontradas ilhas CpG a -388pb de distância do sítio de início de transcrição, que se mostrou significativamente mais metilada nas amostras de cirrose com câncer [45]. Já em leucemia linfoblástica aguda infantil, 84% dos GpGs identificados estavam metilados em amostras sem a expressão de *MME*, e nenhum CpG estava metilado nas amostras com expressão de *MME*, sugerindo que a metilação em sítios de ligação de fatores de transcrição contribui com o silenciamento desse gene [46]. Estudos futuros de padrão de metilação de ilhas CpG na região promotoras do gene da neprilisina e da butirilcolinesterase poderão contribuir para explicar a baixa expressão no câncer de mama.

Expressão não diferenciada dos genes *ACHE* e *EPHB4*

Nas amostras de câncer de mama, a quantidade de transcritos menos expressos e mais expressos foi estatisticamente semelhante, sendo para o gene *ACHE*: 57,8% vs 37,8% ($p = 0,170$) e para o gene *EPHB4*: 42,2% vs 46,4% ($p=0,752$) respectivamente. Foi obtido também um grupo de amostras (4,4% em *ACHE* e 11,1% em *EPHB4*) cuja expressão não se encontra alterada.

Comparando o FC nas amostras de câncer e de tecido normal, vimos que no gene *ACHE* o tecido tumoral apresenta uma média de expressão sutilmente maior (quase 2x) que o tecido normal ($t = -2,047$; $p = 0,046$) mesmo exibindo perfis de expressão bem semelhantes. Essa diferença não é vista no gene *EPHB4*, pois nos dois tecidos a expressão desse gene encontra-se igualmente alterado ($t = -0,317$; $p = 0,752$),

A média de expressão do gene *ACHE* um pouco mais elevada no tumor quando comparado ao tecido normal se deve ao fato de uma amostra possuir um valor de FC muito acima da média (FC = 11.861; média 1.7955). Quando esse indivíduo é excluído da análise, a média de expressão diminui, ficando significativamente próxima da encontrada no tecido normal. A sutil diferença entre as médias de FC nos dois tecidos para o gene *ACHE* está influenciada pelo valor de expressão de um único indivíduo e não reflete o comportamento da maioria das amostras. Por isso, podemos afirmar que não existe diferença no perfil de expressão obtido no tumor e na mama normal.

Semelhantemente, Munhoz-Delgado *et al.*, 2010 [11], demonstraram que não há diferença entre o conteúdo de mRNA de *ACHE* em rim não afetado e células de carcinoma renal.

No tecido mamário a expressão de *EPHB4* tem sido relatada principalmente por testes imunohistoquímicos e apresenta resultados contraditórios. Berclaz *et al.*, 2002 [47] comparou a expressão desse receptor durante a carcinogênese, indicando a presença de EphB4 no tecido normal e pouca expressão em quase todos os carcinomas invasivos analisados, e sugeriu que em câncer de mama a expressão de *EPHB4* não é compatível com a progressão do tumor.

Diferentemente, Kumar *et al.*, 2006 [48] demonstraram que EphB4 está expresso em 58% das 12 amostras de câncer e altamente expresso em 100% nas 4 linhagens celulares de câncer, e não foi observada expressão nas células do epitélio normal da mama. Resultado semelhante foi relatado por Wu *et al.*, 2004 [49], com forte presença da proteína em 35% das amostras tumorais, no entanto não existe correlação entre o alto nível de proteína e a quantidade de mRNA analisada por RT-PCR, pois os transcritos foram igualmente encontrados no tecido normal e tumoral.

O perfil obtido pelo presente trabalho nas amostras de tumor indica que não há diferença entre a quantidade de pacientes com maior ou menor expressão do gene *EPHB4*. Dado que confirma o perfil da expressão dessa proteína em 126 amostras de carcinoma ductal invasivo, em que a porcentagem de expressão positiva e negativa é próxima de 50% [50]. Mas nossos dados diferem quanto à comparação da expressão entre tecido normal e tumoral. Os outros autores encontraram uma significativa menor expressão no tecido normal, e nós não encontramos essa diferença do padrão de expressão entre os dois tecidos.

Para verificar se a expressão de *EPHB4* e *ACHE* estaria sendo impulsionada por alterações estruturais sofridas por esses genes (tendência à amplificação) como descrito em trabalho anterior [28] foram correlacionados o FC e os valores de Q, relativos à alteração do número de cópias. Mas nenhuma correlação foi encontrada.

Os resultados de igualdade no perfil de expressão entre os tecidos normal e tumoral, a semelhança na quantidade de transcrito mais expresso e menos expresso no carcinoma mamário, bem como a ausência de correlação com os parâmetros histopatológicos, nos permite sugerir que provavelmente o padrão de expressão obtido neste estudo parece ser um comportamento comum dos genes *ACHE* e *EPHB4* na mama normal e no tumor, e não um evento influenciado pelo processo de carcinogênese.

Referências:

1. Autores não listados (2002) Gene expression and cancer: getting it together. *Nature genetics* 311: 1-2.
2. Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, Dupree JL (1999) Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environmental health perspectives* 107 Suppl 181-87.
3. Layer PG (1991) Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cellular and molecular neurobiology* 11 (1): 7-33.
4. Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews Neuroscience* 2 (4): 294-302.
5. Stephenson J, Czepulkowski B, Hirst W, Mufti GJ (1996) Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). *Leukemia research* 20 (3): 235-241.
6. Soreq H, Lapidot-Lifson Y, Zakut H (1991) A role for cholinesterases in tumorigenesis? *Cancer Cells* 3 (12): 511-516.
7. Chen Q, Watson JT, Marengo SR, Decker KS, Coleman I, Nelson PS, Sikes RA (2006) Gene expression in the LNCaP human prostate cancer progression model: progression associated expression in vitro corresponds to expression changes associated with prostate cancer progression in vivo. *Cancer letters* 244 (2): 274-288.

8. Mandruzzato S, Callegaro A, Turcatel G, Francescato S, Montesco MC, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Rossi CR, Biciato S, Wang E *et al* (2006) A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma. *Journal of translational medicine* 450.
9. Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Kovacs G, Vidal CJ (2010) Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types. *The FEBS journal* 277 (21): 4519-4529.
10. Racz A, Brass N, Heckel D, Pahl S, Remberger K, Meese E (1999) Expression analysis of genes at 3q26-q27 involved in frequent amplification in squamous cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 35 (4): 641-646.
11. Razon N, Soreq H, Roth E, Bartal A, Silman I (1984) Characterization of activities and forms of cholinesterases in human primary brain tumors. *Experimental neurology* 84 (3): 681-695.
12. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M *et al* (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature genetics* 24 (3): 227-235.
13. Montenegro MF, Ruiz-Espejo F, Campoy FJ, Munoz-Delgado E, de la Cadena MP, Rodriguez-Berrocal FJ, Vidal CJ (2006) Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63 (18): 2175-2182.
14. Perry C, Sklan EH, Birikh K, Shapira M, Trejo L, Eldor A, Soreq H (2002) Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene* 21 (55): 8428-8441.
15. Nakamoto M, Bergemann AD (2002) Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microscopy research and technique* 59 (1): 58-67.
16. Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, Pasquale EB (2004) Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (15): 5583-5588.
17. Berclaz G, Andres AC, Albrecht D, Dreher E, Ziemiecki A, Gusterson BA, Crompton MR (1996) Expression of the receptor protein tyrosine kinase myk-1/htk in normal and malignant mammary epithelium. *Biochemical and biophysical research communications* 226 (3): 869-875.
18. Rawlings ND, Barrett AJ (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology* 248:183-228.
19. Gee NS, Bowes MA, Buck P, Kenny AJ (1985) An immunoradiometric assay for endopeptidase-24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues. *The Biochemical journal* 228 (1): 119-126.
20. Johnson AR, Ashton J, Schulz WW, Erdos EG (1985) Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *The American review of respiratory disease* 132 (3): 564-568.
21. Painter RG, Dukes R, Sullivan J, Carter R, Erdos EG, Johnson AR (1988) Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 263 (19): 9456-9461.
22. Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D *et al* (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature medicine* 4 (1): 50-57.
23. Shipp MA, Stefano GB, Switzer SN, Griffin JD, Reinherz EL (1991) CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced

- changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood* 78 (7): 1834-1841.
24. Velazquez EF, Yancovitz M, Pavlick A, Berman R, Shapiro R, Bogunovic D, O'Neill D, Yu YL, Spira J, Christos PJ *et al* (2007) Clinical relevance of neutral endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma. *Journal of translational medicine* 52.
 25. Gusterson BA, Monaghan P, Mahendran R, Ellis J, O'Hare MJ (1986) Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. *Journal of the National Cancer Institute* 77 (2): 343-349.
 26. Mechttersheimer G, Kruger KH, Born IA, Moller P (1990) Antigenic profile of mammary fibroadenoma and cystosarcoma phyllodes. A study using antibodies to estrogen- and progesterone receptors and to a panel of cell surface molecules. *Pathology, research and practice* 186 (4): 427-438.
 27. Tse GM, Tsang AK, Putti TC, Scolyer RA, Lui PC, Law BK, Karim RZ, Lee CS (2005) Stromal CD10 expression in mammary fibroadenomas and phyllodes tumours. *Journal of clinical pathology* 58 (2): 185-189.
 28. Boberg DR, Batistela MS, Pecharki M, Ribeiro EM, Cavalli IJ, Lima RS, Urban CA, Furtado-Alle L, Souza RL (2012) Copy number variation in *ACHE/EPHB4* (7q22) and in *BCHE/MME* (3q26) genes in sporadic breast cancer. *Chemico-biological interactions*.
 29. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402-408.
 30. Makretsov NA, Hayes M, Carter BA, Dabiri S, Gilks CB, Huntsman DG (2007) Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20 (1): 84-89.
 31. Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Bamba M, Kobayashi TK, Hattori T (2002) Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15 (4): 397-405.
 32. Kalof AN, Tam D, Beatty B, Cooper K (2004) Immunostaining patterns of myoepithelial cells in breast lesions: a comparison of CD10 and smooth muscle myosin heavy chain. *Journal of clinical pathology* 57 (6): 625-629.
 33. Toussaint J, Durbecq V, Altintas S, Doriath V, Rouas G, Paesmans M, Bedard P, Haibe-Kains B, Tjalma WA, Larsimont D *et al* (2010) Low CD10 mRNA expression identifies high-risk ductal carcinoma in situ (DCIS). *PloS one* 5 (8).
 34. Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, Retz M, Zwergel T, Bex A, Stoeckle M *et al* (2000) Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *The Prostate* 45 (3): 207-215.
 35. Or YY, Hui AB, Tam KY, Huang DP, Lo KW (2005) Characterization of chromosome 3q and 12q amplicons in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *International journal of oncology* 26 (1): 49-56.
 36. Sugita M, Tanaka N, Davidson S, Sekiya S, Varella-Garcia M, West J, Drabkin HA, Gemmill RM (2000) Molecular definition of a small amplification domain within 3q26 in tumors of cervix, ovary, and lung. *Cancer genetics and cytogenetics* 117 (1): 9-18.
 37. Chiang WF, Hung PS, Liu SY, Yuan TC, Chang KW, Chen YP, Liu YC, Lin SC (2011) Increase of *ZASC1* gene copy number in recurrent oral carcinoma. *Oral diseases* 17 (1): 53-59.

38. Imoto I, Yuki Y, Sonoda I, Ito T, Shimada Y, Imamura M, Inazawa J (2003) Identification of ZASC1 encoding a Kruppel-like zinc finger protein as a novel target for 3q26 amplification in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer research* 63 (18): 5691-5696.
39. Lin SC, Liu CJ, Ko SY, Chang HC, Liu TY, Chang KW (2005) Copy number amplification of 3q26-27 oncogenes in microdissected oral squamous cell carcinoma and oral brushed samples from areca chewers. *The Journal of pathology* 206 (4): 417-422.
40. Riazimand SH, Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Jacob R, Mann WJ (2002) Investigations for fine mapping of amplifications in chromosome 3q26.3-28 frequently occurring in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology* 63 (4): 385-392.
41. Kuijper A, Snijders AM, Berns EM, Kuenen-Boumeester V, van der Wall E, Albertson DG, van Diest PJ (2009) Genomic profiling by array comparative genomic hybridization reveals novel DNA copy number changes in breast phyllodes tumours. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* 31 (1): 31-39.
42. Pinto AE, Roque L, Rodrigues R, Andre S, Soares J (2006) Frequent 7q gains in flow cytometric multiploid/hypertetraploid breast carcinomas: a study of chromosome imbalances by comparative genomic hybridisation. *Journal of clinical pathology* 59 (4): 367-372.
43. Weber-Mangal S, Sinn HP, Popp S, Klaes R, Emig R, Bentz M, Mansmann U, Bastert G, Bartram CR, Jauch A (2003) Breast cancer in young women (< or = 35 years): Genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. *International journal of cancer Journal international du cancer* 107 (4): 583-592.
44. Wessels LF, van Welsem T, Hart AA, van't Veer LJ, Reinders MJ, Nederlof PM (2002) Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer research* 62 (23): 7110-7117.
45. Archer KJ, Mas VR, Maluf DG, Fisher RA (2010) High-throughput assessment of CpG site methylation for distinguishing between HCV-cirrhosis and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Molecular genetics and genomics : MGG* 283 (4): 341-349.
46. Ikawa Y, Sugimoto N, Koizumi S, Yachie A, Saikawa Y (2010) Dense methylation of types 1 and 2 regulatory regions of the CD10 gene promoter in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL/AF4 fusion gene. *Journal of pediatric hematology/oncology* 32 (1): 4-10.
47. Berclaz G, Flutsch B, Altermatt HJ, Rohrbach V, Djonov V, Ziemiecki A, Dreher E, Andres AC (2002) Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. *Oncology reports* 9 (5): 985-989.
48. Kumar SR, Singh J, Xia G, Krasnoperov V, Hassanieh L, Ley EJ, Scehnet J, Kumar NG, Hawes D, Press MF *et al* (2006) Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *The American journal of pathology* 169 (1): 279-293.
49. Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM (2004) Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathology oncology research : POR* 10 (1): 26-33.
50. Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, Badu-Nkansah A, Walter DL, Shyr Y, Chen J (2011) Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PloS one* 6 (9): e24426.

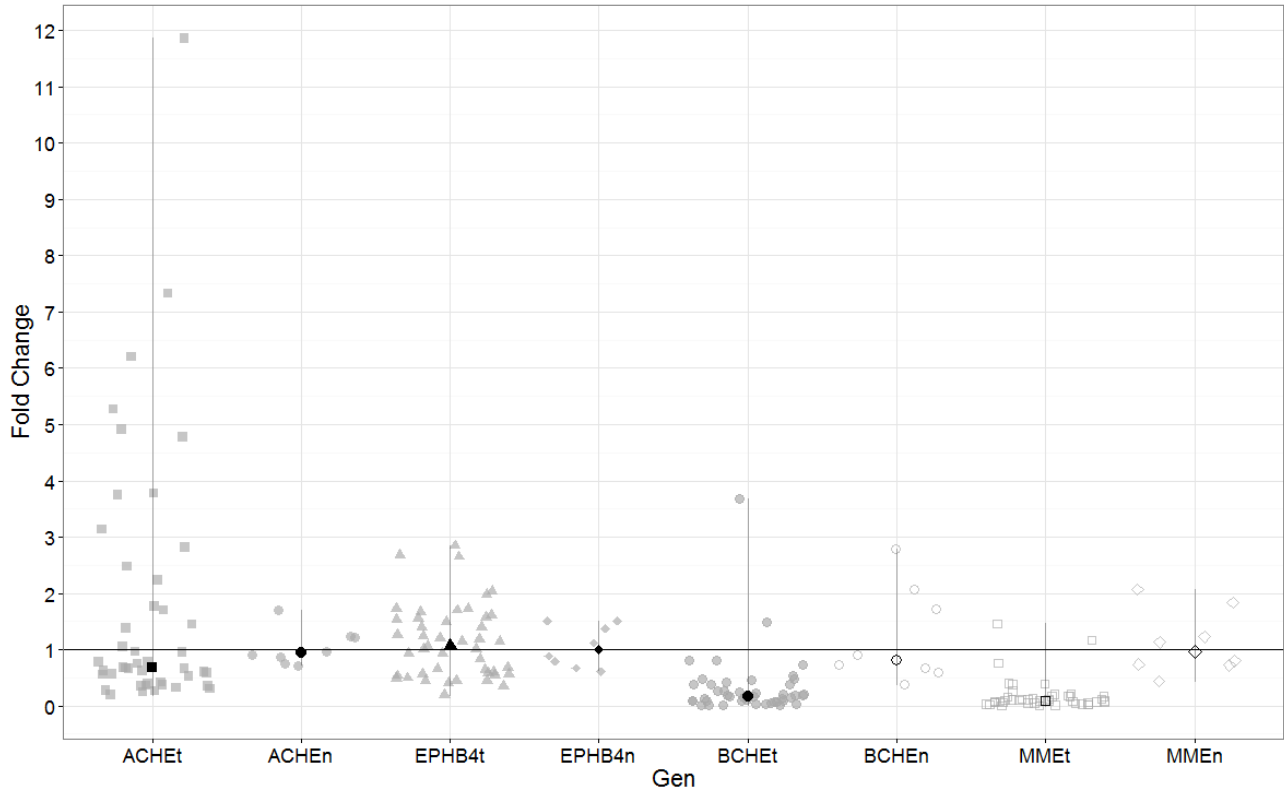


Figura 1 – Valores de expressão relativa (*Fold Change*) dos genes *ACHE*, *EPHB4*, *BCHE* e *MME* nas amostras de tumor (t) e de tecido normal (n). Os pontos pretos são referentes à mediana.

DISCUSSÃO

A investigação acerca da alteração do número de cópias e da expressão nas regiões dos genes *ACHE-EPHB4* e *BCHE-MME* nos trouxe resultados que possibilitam inferir que para a amostra estudada as amplificações e deleções encontradas não possuem influência direta na expressão desses genes no carcinoma mamário.

Esse resultado pode ter sido influenciado pela redução no número de amostras que foram incluídas nas duas análises. Das 32 amostras que compunham o estudo de alteração do número de cópias, apenas 25 puderam ter a expressão analisada. Um outro fator é a heterogeneidade dessa amostra em relação ao tipo histológico (ductal, misto, lobular, tubular, e outros). Como cada tipo histológico pode ter tido um histórico particular de eventos genéticos na progressão do tumor, isso pode ter inviabilizado a correlação entre as análises de alteração do número de cópias e expressão, bem como com os parâmetros histopatológicos.

Em estudo realizado em nosso laboratório, Bernardi *et al* (2010) demonstrou que os genes *ACHE* e *BCHE* encontram-se alterados (amplificados ou deletados) em grande parte das pacientes portadoras de câncer de mama esporádico, sendo a deleção o evento mais frequente para ambos os genes. Quando se comparam os resultados obtidos por Bernardi com o do presente trabalho, vê-se que eles não são concordantes, uma vez que para o gene *ACHE* a alteração mais frequente foi a amplificação. É facilmente entendível que esses dados discordam visto que cada trabalho foi desenvolvido com amostras distintas, e as análises estatísticas também foram diferentes.

Diante da ausência de correlação entre alterações estruturais e os níveis de expressão, pode-se sugerir que as alterações no número de cópias ocorram devido aos já conhecidos oncogenes abrigados próximos às regiões 7q22 e 3q26, e que a expressão seja regulada por outro mecanismo que não o aumento ou diminuição da dosagem gênica. Esses eventos parecem ocorrer mais como consequência do que causa da tumorigênese. Isso pode ser reforçado pela ausência de relação das alterações do número de cópias e da expressão diferenciada com os dados clínicos histopatológicos. Nem mesmo quando as funções dessas proteínas tinham estreita ligação com o desenvolvimento e progressão da doença.

Futuros estudos com diferente abordagem, como a investigação de mecanismos de regulação da expressão, possam esclarecer melhor a relação desses genes com o câncer de mama.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos na análise de alteração no número de cópias, podemos concluir que:

- As ampliações e deleções demonstradas abrangem uma região maior do que apenas os genes *ACHE* e *BCHE*.
- Não existe uma relação causal direta dessas alterações com o desenvolvimento do tumor.
- A alteração no número de cópias pode ser uma consequência do processo neoplásico, e que de alguma forma torna-se vantajoso para a progressão da doença.

Em relação aos resultados do estudo de análise da expressão, pode-se inferir que:

- Os genes *BCHE* e *MME* possuem perfil de baixa expressão em quase 100% das amostras de tumor. E a média de expressão no tecido normal é significativamente mais alta.
- Não existe correlação entre a alteração estrutural (tendência à deleção) desses genes com a respectiva baixa expressão.
- O perfil de expressão dos genes *ACHE* e *EPHB4* é igual no tumor e na mama normal, sugerindo que seja um comportamento comum e não influenciado pelo desenvolvimento do câncer.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSON, D.G.; COLLINS, C.; MCCORMICK, F.; GRAY, J.W. Chromosome aberrations in solid tumors. **Nat Genet**, vol.34, n.4, p.369-376, 2003.
- AMENDOLA, L.C.B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, p.325-330, 2005.
- ANDRES, AC; REID, HH; ZÜRCHER, G; BLASCHKE, RJ; ALBRECHT, D; ZIEMIECKI, A. Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. **Oncogene** v.9, n.8, 2431. 1994.
- APPLIED BIOSYSTEMS: Quantifiler kits. São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/7j2orxf7.pdf>. Acesso em 28/07/2011.
- APPLIED BIOSYSTEMS: Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, 2008.
- ARPAGAUS, M.; KOTT, S.M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, Washington, v.29, n.1, p.124-131, 1990.
- BAI, M.; AGNANTIS, N.J.; SKYRLAS, A.; TSANOU, E.; KAMINA, S.; GALANI, V.; KANAVAROS, P. Increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. **Mod Pathol**, v.16, p.471-480, 2003.
- BARBOSA, M.; RIOS, O.; VELASQUEZ, M.; VILLALOBOS, J.; EHRMANN, J. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors. **Surgical Neurology**, v.55, p.106-112, 2001.
- BARKER, P.E.; SHIPP, M.A.; D'ADAMIO, L.; MASTELLER, E.L.; REINHERZ, E.L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). **J Immunol**, v.142, p.283-287, 1989.
- BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L. E LA DU, B. N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.
- BARTELS, C. F.; JENSEN, F. S.; LOCKRIDGE, O.; WAN DER SPEK, A. F. L.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T.; LA DU, B. N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.** , v. 50, p. 1086-11103, 1992.
- BLANQUICETT, C.; JOHNSON, M.R.; HESLIN, M.; DIASIO, R.B. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v.303, p.209–214, 2002.

BEN AZIZ-ALOYA R.; SEIDMAN S.; TIMBERG R.; STERNFELD M.; ZAKUT H.; SOREQ H. Expression of a human acetylcholinesterase promoter-reporter construct in developing neuromuscular junctions of *Xenopus embryos*. **Proc. Natl Acad. Sci**, v.90, p.2471-2475, 1993.

BENNETT BD, WANG Z, KUANG WJ, WANG A, GROOPMAN JE, GOEDDEL DV, SCADDEN DT. Cloning and characterization of HTK, a novel transmembrane tyrosine kinase of the EPH subfamily. **J Biol Chem**. v.269, n.19, p.14211-14218, 1994.

BERCLAZ, G; ANDRES, AC; ALBRECHT, D; DREHER, E; ZIEMIECKI, A; GUSTERSON, BA; CROMPTON, MR. Expression of the receptor protein tyrosine kinase myk-1/htk in normal and malignant mammary epithelium. **Biochem Biophys Res Commun**. v.226, n.3, p.869-875, 1996.

BERCLAZ, G; KARAMITOPOULOU, E; MAZZUCHELLI, L; ROHRBACH, V; DREHER, E; ZIEMIECKI, A; ANDRES AC. Activation of the receptor protein tyrosine kinase EphB4 in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. **Ann Oncol**. v.14, n.2, p.220-226, 2003.

BERNARDI, CAROLINA. **Estudo sobre amplificação e deleção dos genes *BCHE* e *ACHE* em portadoras de câncer de mama esporádico**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BIGBEE, J.W.; SHARMA, K.V.; GUPTA, J.J.; DUPREE, J.L. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. **Environmental Health Perspectives**, v.107, n.S1, p.81-87, 1999.

BIGNON, J.D.; FERNÁNDEZ-VIÑA, M.A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplifications by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In: Charron D, ed. **Genetic diversity of HLA: Functional and medical implication**, Paris, 584-95, 1997.

BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v.64, p.235-248, 1991.

BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia**/[editor] FILHO, G.B. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.637-638, 2006.

BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; RADIC, Z.; MARCHOT, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. **EMBO J**, v.22, p.1-12, 2003.

BRASS, N.; RACZ, A.; HECKEL, D.; REMBERGER, K.; SYBRECHT, G.W.; MEESE, E.U. Amplification of the genes *BCHE* and *SLC2A2* in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. **Cancer Research**, v.57, p.2290-2294, 1997.

BRÜCKNER, K; KLEIN, R. Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. **Curr Opin Neurobiol**. v.8, n.3, p375-382, 1998.

BURDALL, S.E.; HANBY, A.M.; LANSDOWN, M.R.; SPEIRS, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Research**, v.5, p.89-95, 2003.

CAMPBELL, J.M.; LOCKWOOD, W.W.; BUYS, T.P.; CHARI, R.; COE, B.P.; LAM, S.; LAM, W.L. Integrative genomic and gene expression analysis of chromosome 7 identified novel oncogene loci in non-small cell lung cancer. **Genome**, v.51, p.1032-1039, 2008.

CARMONA, G.N.; JUFER, R.A.; GOLDBERG, S.R.; GORELICK, D.A.; GREIG, N.H.; YU, Q.; CONE, E.J.; SCHINDLER, C.W. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v.28, p.367-371, 2000.

CARR, J.A.; HAVSTAD, S.; ZARBO, R.J.; DIVINE, G.; MACKOWIAK, P.; VELANOVICH, V. The association of *HER-2/neu* amplification with breast cancer recurrence. **Archives of surgery**, v.135, p.1469-1474, 2000.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical Journal**, Londres, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

CIOSSEK, T.; LERCH, M.M.; ULLRICH, A. Cloning, characterization, and differential expression of MDK2 and MDK5, two novel receptor tyrosine kinases of the eck/eph family. **Oncogene**, v.11, n.10, p.2085-2095, 1995.

D'ADAMIO, L.; SHIPP, M.A.; MASTELLER, E.L.; REINHERZ, E.L. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86, p.7103-7107, 1989.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, p.131-138, 2003.

DeFELICE, E.A. Breast Cancer: Web Resource Guide for Consumers, Healthcare Providers, Patients, and Physicians. Editora iUniverse, 2002. Disponível em: <<http://books.google.com/books>> Acesso em agosto de 2009.

DEVAULT, A.; LAZURE, C.; NAULT, C.; LE MOUAL, H.; SEIDAH, N.G.; CHREÂ TIEN, M.; KAHN, P.; POWELL, J.; MALLET, J.; BEAUMONT, A. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. **EMBO J**, v.6, p.1317-1322, 1987.

DOPEÑO, H.; MATEO-LOZANO, S.; MAZZOLINI, R.; RODRIGUES, P.; LAGARES-TENA, L.; CERON, J.; ROMERO, J.; ESTEVES, M.; LANDOLFI, S.; HERNÁNDEZ-LOSA, J.; CASTAÑO, J.; WILSON, A.J.; RAMON, Y.; CAJAL, S.; MARIADASON, J.M.; SCHWARTZ, S.J.R.; ARANGO, D. The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis. **Cancer Res**, v.69, n.18, p.7430-7438, 2009.

DORAK, M.T. Real-Time PCR (Advanced Methods Series). Oxford: Taylor & Francis, 2006. Disponível em: <<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>> Acesso em Setembro de 2010.

DUYSEN, E.G.; LI, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs

and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. **Toxicology**, v.233, p.60-69, 2007.

EHRlich, G.; VIEGAS-PEQUIGNOT E.; GINZBERG D.; SINDEL L.; SOREQ H.; ZAKUT H. Mapping the human acetylcholinesterase gene to chromosome 7q22 by fluorescent in situ hybridization coupled with selective PCR amplification from a somatic hybrid cell panel and chromosome-sorted DNA libraries. **Genomics**, v.13, p.1192-7, 1992.

EUROGENTEC. **qPCR Guide**. Tutorial.

FEUK, L.; CARSON, A.R.; SCHERER, S.W. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet**, vol.7, n.2, p.85-97, 2006a.

FEUK, L.; MARSHALL, C.R.; WINTLE, R.F.; SCHERER, S.W. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. **Hum Mol Genet**, vol.15 Spec No 1, p.R57-66, 2006b.

GALE, NW; YANCOPOULOS GD. Ephrins and their receptors: a repulsive topic? **Cell Tissues Res**. v. 290, n.2, p.227-241.

GALENKO-YAROSHEVSKII, A.P.; DERLUGOV, L.P.; PONOMAREV, V.V.; DUKHANIN A.S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new local anesthetic agent. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Nova lorque, v.136, n.2, p.170-173, 2003.

GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, I.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromossomo 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, San Diego, v.11, n.2, p.455-458, 1991.

GEE, N.S.; BOWES, M.A.; BUCK, P.; KENNY, A.J. An immunoradiometric assay for endopeptidase-24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues. **Biochem J**. v.228, p.119-126, 1985.

GETMAN D.K.; EUBANKS J.H.; CAMP S.; EVANS G.A.; TAYLOR P. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. **Am J Hum Genet**, v.51, p.170-7, 1992.

GINZINGER, D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p.503-512, 2002.

GIRARD, E; BERNARD, V.; MINIC, J.; CHATONNET, A.; KREJCI, E.; MOLGÓ J. Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. **Life Sciences**, v.80, p.2380–2385, 2007.

GNATT A, GINZBERG D, LIEMAN-HURWITZ J, ZAMIR R, ZAKUT H, SOREQ H. Human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are encoded by two distinct genes. **Cell Mol Neurobiol**. v.11, p.91-104, 1991.

GOLUB, T.R.; SLONIM, D.K.; TAMAYO, P.; HUARD, C.; GAASENBEEK, M., et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science**, vol.286, n.5439, p.531-537, 1999.

GOODSELL, D.S. **Protein data bank**: Acetylcholinesterase. Disponível em: <http://pdb.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb54_1.html>. Acesso 20/10/2010.

GREAVES, M. F.; BROWN, G.; RAPSON, N. T.; LISTER, T. A. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v.4, p.67-84, 1975.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, v.264, p.672-686, 1999.

GUSTERSON, B.A.; MONAGHAN, P.; MAHENDRAN, R.; ELLIS, J.; O'HARE, M.J. Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. **J Natl Cancer Inst**, v.77, p.343-349, 1986.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

HIMANEN, JP; NIKOLOV, DB. Eph signaling: a structural view. **Trends Neurosci.** v.26, n.1, p.46-51, 2003.

HIRAI H, MARU Y, HAGIWARA K, NISHIDA J, TAKAKU F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. **Science**, V.238, p.1717-1720, 1987.

HOUAS, H.; MORELLO, D.; LAVENU, A.; BILLARD, M.; JASMIN, C.; BOUCHEIX, C. Characterization of the 5' região of the cd10/neutral endopeptidase 24.11 gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v.207, p.933-942, 1995.

HUANG, W.B.; ZHOU, X.J.; CHEN, J.Y.; ZHANG, L.H.; MENG, K.; MA, H.H.; LU, Z.F. CD10-positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis. **Jpn J Clin Oncol**, v.35, p.245-250, 2005.

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer e Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008> > Acesso em agosto de 2009.

IWAYA, K.; OGAWA, H.; IZUMI, M.; KURODA, M.; MUKAI, K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. **Virchows Arch**, v.440, p.589-593, 2002.

IWATA, N.; HIGUCHI, M.; SAIDO, T.C. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. **Pharmacol Ther**, vol.108, n.2, p.129-148, 2005.

JOHNSON, A. R.; ASHTON, J.; SCHULZ, W.; ERDOS E., G. Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. **Am. Rev. Respir. Dis**, v.132, p.564-568, 1985.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, p.781-790, 2000.

KALO, MS; PASQUALE, EB. Signal transfer by Eph receptors. **Cell Tissue Res.** v.298, n.1, p.1-9, 1999.

KALLOW, W.; GUNN, D. R. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. **Ann. Hum. Genet.**, v. 23, p. 239-250, 1959.

KARPEL R.; BEN AZIZ-ALOYA R.; STERNFELD M.; EHRLICH G.; GINZBERG D.; TARRONI P.; CLEMENTI F.; ZAKUT H.; SOREQ H. Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. **Exp. Cell. Res.**, v.210, p.268-277. 1994.

KAUFER D.; FRIEDMAN A.; SEIDMAN S.; SOREQ H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature**, v.393, p.373-377, 1998.

KENNY, A. J.; STEPHENSON, S.L. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. **FEBS Lett**, v.232, p.1-8, 1988.

KEREM A.; KRONMAN C.; BAR NUN S.; SHAFFERMAN A.; VELAN B. Interrelations between assembly and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.180-184, 1993.

KERR, M.A.; KENNY, A.J. The purification and specificities of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. **Biochem J**, v.137, p.477-488, 1974.

KÖNIGSHOFF, M.; WILHELM, J.; BOHLE, R.M.; PINGOUD, A.; HAHN, M. *HER-2/neu* gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.49, n.2, p.219-229, 2003.

KUANG, SQ; BAI, H; FANG, ZH; LOPEZ, G; YANG, H; TONG, W; WANG, ZZ; GARCIA-MANERO, G. Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of Eph receptor tyrosine kinases and ephrin ligands in acute lymphoblastic leukemia. **Blood.** v.115, n.12, p.2412-2419, 2010.

KUMAR, SR; SINGH, J; XIA, G; KRASNOPEROV, V; HASSANIEH, L; LEY, EJ; SCEHNET, J; KUMAR, NG; HAWES, D; PRESS, MF; WEAVER, FA; GILL, PS. Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. **Am J Pathol.** v.169, n.1, p.279-293, 2006.

KVITKO, K. A Carcinogênese e seus Agentes In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

LA MOTA, R. V.; MCCOMB, R. B.; NOLL J R.; WETSTONE, H. J.; REINFRANK, R. F. Multiples forms of serum cholinesterase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 124, p. 299-308, 1968.

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C.A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.4715-4719, 1989.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, Londres, v.6, n.62, 2005.

LAYER, P.G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.11, p.7-33, 1991.

LAYER, PG; WILLBOLD, E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v.29, p.1-94, 1995.

LAZEBNIK, Y. What are the hallmarks of cancer?. **Nat Rev Cancer**, vol.10, n.4, p.232-233, 2010.

LETARTE, M.; VERA, S.; TRAN, R.; ADDIS, J.B.L.; ONIZUKA, R.J.; QUACKENBUSH, E.J; JONGENEEL, C.V; MCINNES, R.R. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. **J Exp Med**, v.168, p.1247- 1253,1988.

LIAO J.; HEIDER H.; SUM M.C.; BRODBECK U. Different glycosylation in acetylcholinesterases from mammalian brain and erythrocytes. **J. Neurochem**, v.58, p.1230-1238, 1992.

LIFE TECHNOLOGIES, **DataAssist™ v3.01 Software User Instructions**. Tutorial.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, vol.25, n.4, p.402-408, 2001.

LOCKRIDGE, O.; MOTTERSHAW-JACKSON, N.; ECKERSON H.; LA DU, B.N. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.215, p.1-8, 1980.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12012-12018, 1982.

LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C K.; NORTON, S.E. E JOHNSON, L.L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 549-557, 1987.

LYNG, MB; LAENKHOLM, AV; PALLISGAARD, N; DITZEL, HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. **BMC, Cancer**. v. 22, p.8-20, 2008.

MAKRETSOV, N.A.; HAYES, M.; CARTER, B.A.; DABIRI, S.;GILKS, C.B.; HUNTSMAN, D.G. Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. **Mod Pathol**, v.20, p.84-89, 2007.

MALFROY, B.; KUANG, W.J.; SEEBURG, P.H.; MASON, A.J.; SCHOFIELD, P.R. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). **FEBS Lett**, v.229, p.206-210, 1988.

MALFROY, B.; SWERTS, J.P.; GUYON, A.; ROQUES, B.P. High-affinity enkephalindegrading peptidase in brain is increased after morphine. **Nature**, v.276, p.523-526, 1978.

MARTÍNEZ-MORENO, P.; NIETO-CERÓN, S.; TORRES-LANZAS, J.; RUIZESPEJO, F.; TOVAR-ZAPATA, I.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZLÓPEZ, J.N.; VIDAL, C.J.; CABEZAS-HERRERA, J. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. **Carcinogenesis**, v.27, p.429-436, 2006.

MARX, J. Learning how to suppress cancer. **Science**, v.261, p.1385-1387, 1993.

MASSON, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 578, p. 493-504, 1979.

MASSOULIÉ J.; BON S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annu Rev Neurosci**, v.5, p.57-106, 1982.

MASSOULIÉ J.; SUSSMAN J.; BON S.; SILMAN I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Prog Brain Res**, v.98, p.139-46, 1993.

MATSAS, R.; FULCHER, I.S.; KENNY, A.J.; TURNER, A.J. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolysed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.80, p.3111-3115, 1983.

MCGUIRE, M. C.; NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LOCKRIDGE, O. LA DU, B. N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 953-57, 1989.

MECHTERSHEIMER G, KRÜGER KH, BORN IA, MÖLLER P. Antigenic profile of mammary fibroadenoma and cystosarcoma phyllodes. A study using antibodies to estrogen- and progesterone receptors and to a panel of cell surface molecules. **Pathol Res Pract**, v.186, p.427-438, 1990.

MIKAMI, L.R.; WIESELER, S.; SOUZA, R.L.R.S.; SCHOPFER, L.M.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.18, p.213-218, 2008.

MOHAJERI, M.H.; WOLLMER, M.A.; NITSCH, R.M. Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. **J Biol Chem**, v.277, p.35460–35465, 2002.

MONTENEGRO, M.F.; NIETO-CERON, S.; RUIZ-ESPEJO, F.; PAEZ DE LA CADENA, M.; RODRIGUEZ-BERROCAL, F.J.; VIDAL, C.J. Cholinesterase activity and enzyme components in healthy and cancerous human colorectal sections. **Chemico-Biological Interactions**, v.15, p.429-430, 2005.

MORSE, DL; CARROLL, D; WEBERG, L; BORGSTROM, MC; RANGER-MOORE, J; GILLIES, RJ. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of

increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Anal Biochem.** v.342, n.1, p.69-77, 2005.

MUNARINI, N; JÄGER, R; ABDERHALDEN, S; ZUERCHER, G; ROHRBACH, V; LOERCHER, S; PFANNER-MEYER, B; ANDRES, AC; ZIEMIECKI, A. Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. **J Cell Sci.** v.115, n.1, p25-37,2002.

NAKAMOTO, M; BERGEMANN, AD. Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. **Microsc Res Tech,** v.59, n.1, p.58-67, 2002.

NAVARRETE, M.A; MAIER, C.M.; FALZONI, R.; QUADROS, L.G; LIMA, G.R; BARACAT, E.C; NAZÁRIO, A.C. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research,** v. 7, p. 306-313, 2005.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide> > Acesso em agosto de 2009.

NOREN, NK; FOOS, G; HAUSER, CA; PASQUALE, EB. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. **Nat Cell Biol.** v.8, n.8, p.815-825, 2006.

NOREN, NK; LU, M; FREEMAN, AL; KOOLPE, M; PASQUALE, EB. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. **Proc Natl Acad Sci.** v.101, n.15, p.5583-5588, 2004.

NOREN, NK; PASQUALE, EB. Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. **Cancer Res.** v.67, n.9, p.3994-3997, 2007.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia & Desenvolvimento,** n.33, p.10-13, 2004.

OGAWA, H.; IWAYA, K.; IZUMI, M.; KURODA, M.; SERIZAWA, H.; KOYANAGI, Y.; MUKAI, K. Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. **Hum Pathol,** v.33, p.806-811, 2002.

OSMAN, I.; YEE, H.; TANEJA, S.S.; LEVINSON, B.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.; CHANG, C.; NOBERT, C.; NANUS, D.M. Neutral Endopeptidase Protein Expression and Prognosis in Localized Prostate Cancer. **Clin Cancer Res,** v.10, p.4096–4100, 2004.

PAINTER, R.G.; DUKES, R.; SULLIVAN,J.; CARTER, R.; ERDOS, E.G., JOHNSON, A. R. Function of neutral endopeptidase on the cellmembrane of human neutrophils. **J. Biol. Chem,** v.263, p.9456-9461, 1988.

PAPANDREOU, C.N.; USMANI, B.A.; GENG, Y.; BOGENREIDER, T.; FREEMAN, R.; WILK, S.; FINSTAD, C.L.; REUTER, V.E.; POWELL, C.T.; SCHEINBERG, D. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. **Nature Med,** v.4, p.50-57, 1998.

PASQUALE, E.B. Eph-Ephrin Bidirectional Signaling in Physiology and Disease. **Cell**, v.133, p.38-52, 2008.

PINTO, A.E.; ROQUE, LL; RODRIGUES, R.; ANDRÉ S.; SOARES, J. Frequent 7q gains in flow cytometric multiploid/hypertetraploid breast carcinomas: a study of chromosome imbalances by comparative genomic hybridisation. **Journal of Clinical Pathology**, v.59, p.367-72, 2006.

Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: dezembro de 2010.

QUACKENBUSH, E. J.; LETARTE, M. Identification of several cell surface proteins of nonT, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. **J Immunol**, v.134, p.1276-1285, 1985.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods Enzymol**, vol.248, p.183-228, 1995.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4ªed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.110, 2001.

ROQUES, B.P.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, p.245-249, 1993.

ROQUES, B.P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIEÉ-ZALUSKI, M-C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11. Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.45, p.87-146, 1993.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; VIDAL, C.J. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.72, p.11-22, 2002.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; MUÑOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C.J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.80, p.105-114, 2003.

SAIDO T.C.; NAKAHARA, H. Proteolytic Degradation of A β by Neprilysin and Other Peptidases. In: **Madame Curie Bioscience Database** [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6572/>

SAPINO, A., MACRI, L., TONDA, L. AND BUSSOLATI, G. Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland. **Endocrinology**, v.133, p.838-842, 1993.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C_T difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v.84, p.901-910, 2006.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdã, v.46, n.1-2, p.69-81, 2000.

SCHWARTZ, J.C.; DE LA BAUME, S.; MALFROY, B.; PATEY, G.; PERDRISOT, R.; SWERTS, J.P.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C.; GACEL, G.; ROQUES, B.P. "Enkephalinase", a newly characterized dipeptidyl carboxypeptidase: properties and possible role in enkephalinergic transmission. **Int J Neurol**, v.14, p.195-204, 1980.

SEIDMAN S.; STERNFELD M.; BEN AZIZ-ALOYA R.; TIMBERG R.; KAUFER NACHUM D.; SOREQ H. Synaptic and epidermal accumulations of human acetylcholinesterase are encoded by alternative 30-terminal exons. **Mol. Cell. Biol**, v.15, p.2993-3002, 1995.

SHI, J.; ZHANG, S.; TANG, M.; MA, C.; ZHAO, J.; LI, T.; LIU, X.; SUN, Y.; GUO, Y.; HAN, H.; MA, Y.; ZHAO, Z. Mutation screening and association study of the neprilysin gene in sporadic Alzheimer's disease in Chinese persons. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.60, p.301-306, 2005.

SHIPP, M.A.; STEFANO, G.B.; SWITZER, S.N.; GRIFFIN, S.N.; REINHERZ, E.L. CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. **Blood**, v.78, p.1834-1841, 1991.

SHIPP, M.A.; TARR, G.E.; CHEN, C.Y.; SWITZER, S.N.; HERSH, L.B.; STEIN, H.; SUNDAY, M.E.; REINHERZ, E.L. CD10/neutral endopeptidase-24.11 hydrolyzes bombesinlike peptides and regulates the growth of small-cell carcinomas of the lung. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.10662-10666, 1991.

SHPAKOVSKII, D.G., SHEMATOROVA, E.K.; SHPAKOVSKII, G.V. New genes on human chromosome 7: bioinformatic analysis of a gene cluster from the POLR2J family. **Bioorg. Khim.** v.30, p.621-625, 2004.

SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v.28, p.453-483, 1996.

SONG, P.; SEKHON, H.S.; JIA, Y.; KELLER, J.A.; BLUSZTAJN, J.K.; MARK, G.P.; SPINDEL, E.R. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. **Cancer Research**, v.63, p.214-221, 2003.

SOREQ, H.; PATINKIN, D.; LEV-LEHMAN, E.; GRIFMAN, M.; GINZBERG, D.; ECKSTEINT, F.; ZAKUTT, H.; Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.7907-7911, 1994.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.2, n.4, p.294-302, 2001.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.84, p.349- 353, 2005.

STEPHENSON, J.; CZEPULKOWSKI, B.; HIRST, W.; MUFTI, G.J. Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). **Leukemia Research**, v.20, p.235-241, 1996.

STEPHENSON, S.L.; KENNY, A.J. Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. **Biochem J**, vol.241, n.1, p.237-247, 1987.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 19, p. 1607-1615, 2000.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v.253, p.872- 879, 1991.

TAYLOR P.; RADIC Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v.34, p.281-320, 1994.

TSE, G.M.K.; TSANG, A.K.H.; PUTTI, T.C.; SCOLYER, R.A.; LUI, P.C.W., LAW, B.K.B., KARIM, R.Z.; LEE, C.S. Stromal CD10 expression in mammary fibroadenomas and phyllodes tumours. **J Clin Pathol**. v.58, p.185-189, 2005.

TURNER, A.J.; TANZAWA, K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL and PEX. **FASEB J**, v.11, p.355-364, 1997.
VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, v. 7, p. 659-72, 2007.

VAN DE VIJVER, M.J.; HE, Y.D.; VAN'T VEER, L.J.; DAI, H.; HART, A.A., et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med**, vol.347, n.25, p.1999-2009, 2002.

VELAZQUEZ, E.F.; YANCOVITZ, M.; PAVLICK, A.; BERMAN, R.; SHAPIRO, R.; BOGUNOVIC, D.; O'NEILL, D.; YU, Y.L.; SPIRA, J.; CHRISTOS, P.J.; ZHOU, X.K.; MAZUMDAR, M.; NANUS, D.M.; LIEBES, L.; BHARDWAJ, N.; POLSKY, D.; OSMAN, I. Clinical relevance of neutral endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma. **J Transl Med**. v. 5, p.5:2, 2007.

VIDAL, C.J. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. **Chemico-Biological Interactions**, v.15, p.227-232, 2005.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-551, 1947.

ZAKUT, H.; EHRLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SEIDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **The Journal of Clinical Investigation**, v.86, p.900-908, 1990.

APÊNDICE I

Material e Métodos da análise de alteração no número de cópias

Caracterização da amostra

Este estudo foi realizado com amostras gentilmente cedidas pela equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, UFPR, de pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba (PR), sendo essas amostras:

- 1) DNA de fragmentos de tumores de mama;
- 2) DNA de sangue periférico das mesmas pacientes utilizado como grupo controle.

Os dados histopatológicos das 32 pacientes utilizadas nessa etapa estão descritas na tabela 1.

Processamento da amostra

Extração do DNA sanguíneo

Extraído pelo método *salting out*, segundo Bignon; Fernandez-Viña (1997), com modificações. Esta técnica permite a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e precipitação do DNA com etanol. Cerca de 10 ml de sangue periférico é centrifugado com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10 X concentrada: 12,1g de Tris, 110,2 g de MgCl₂, 5,8 g de NaCl) a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo é repetido até a obtenção de um botão de glóbulos brancos que foi incubado a 60° C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5 X (*Invitrogen*), 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultrapura. Em seguida, adiciona-se 100 µl de solução saturada de NaCl (6M) para a precipitação proteica, aproveitando somente o sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, é realizada a precipitação do DNA com a adição de 700 µl de etanol. Ao final do processo a amostra de DNA é diluída em 100 µl de água ultra-pura e armazenada a -20°C até o momento da amplificação por PCR.

Tabela 1 - Informações histopatológicas das pacientes.

Parâmetros	Pacientes (%)
Tamanho do tumor (mm)	
5 – 24	37,5
25 – 44	37,5
45 – 64	6,3
65 – 84	3,1
SI	15,6
Grau do tumor	
I	15,6
II	50
III	15,6
SI	18,8
Metástase nos linfonodos	
Presente	31,3
Ausente	53,1
SI	15,6
Gene <i>HER2</i> amplificado	
Positivo	9,4
Negativo	78,1
SI	12,5
Receptor de estrogênio	
Positivo	71,9
Negativo	15,6
SI	12,5
Receptor de Progesterona	
Positivo	75,0
Negativo	12,5
SI	12,5
Tipo histológico	
Carcinoma ductal	71,8
Carcinoma lobular	6,3
Carcinoma tubular	3,1
Outros	6,3
SI	12,5

SI – sem informação. Fonte: A autora (2012)

Extração de DNA do Tumor

Para a obtenção de DNA de alto peso molecular, o método seguido foi o de fenol-clorofórmio. Os fragmentos do tecido tumoral foram colocados em um tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 80 µL de tampão da proteinase K 5 X, 40 µL

de proteinase K (10 mg/mL), 20 µL de SDS 20% e 240 µL de água ultra-pura, e esse conjunto foi homogeneizado em agitador tipo Vortex. Em seguida, o tubo foi incubado no bloco de aquecimento a 60°C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Na seqüência, foram adicionados 500 µL de fenol saturado pH 8,0 e 400 µL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O tubo, então, foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados a ele 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto para a precipitação do DNA. Em caso de precipitação de pouco DNA, a amostra foi incubada a -20°C por uma hora. Esse novo tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Logo após, foram adicionados 500 µL de etanol 70% e o tubo foi invertido gentilmente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo foi colocado em bloco de aquecimento a 55°C por 10 minutos para que o DNA secasse. A amostra de DNA foi então ressuspensa em 30 a 50 µL de água ultra-pura e retornou ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos, para que a solução de DNA ficasse homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20°C.

Métodos

PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

É uma técnica confiável para a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo baseada na fluorescência. Durante a reação, o sinal fluorescente aumenta na mesma proporção da quantidade de produto amplificado, formando uma curva de amplificação com três fases distintas (exponencial, linear e platô) que caracterizam a progressão da PCR (FIGURA 6).

Na fase exponencial o aumento do produto é proporcional à quantidade inicial e, idealmente, dobra sua quantidade a cada ciclo. Na fase linear, um ou mais componentes da PCR reduz abaixo da concentração crítica e a inclinação da curva começa a diminuir, diminuindo também sua eficiência. Por último, a PCR alcança uma fase estacionária, na qual não é produzido o *amplicon* e o sinal fluorescente permanece relativamente constante, é o platô (SCHEFE *et al.*, 2006).

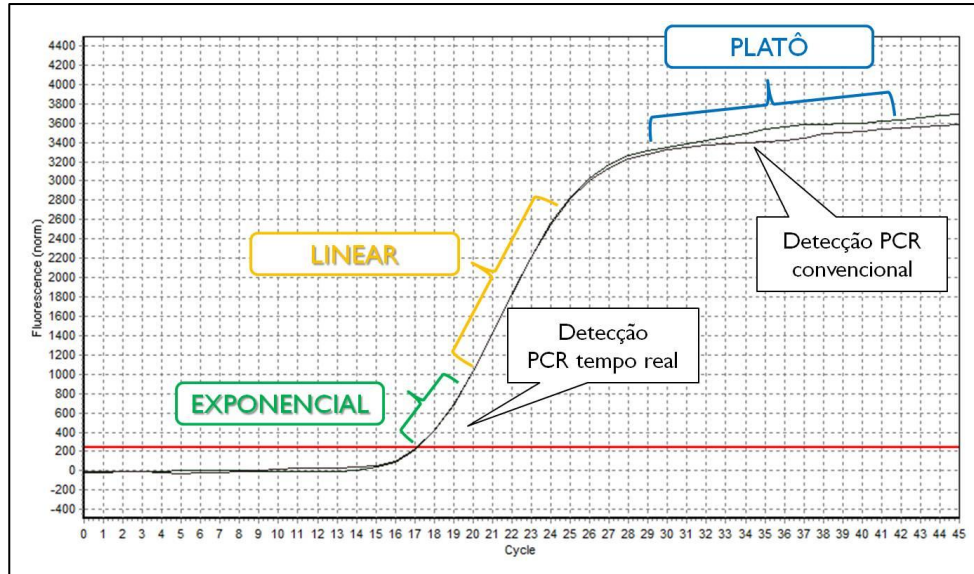


Figura 6 – Fases da curva de amplificação produzida durante a reação de PCR. Imagem gerada pelo software *Realplex* e modificada pela autora.

Por ser capaz de medir os produtos de PCR conforme estes vão se acumulando, é possível saber a quantidade de produto em um determinado ponto na reação ainda na fase exponencial (GINZINGER, 2002). Por este motivo, essa técnica permite a quantificação, o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, pois não mais requer a detecção em gel de eletroforese. Outras vantagens ainda com relação à PCR qualitativa são a maior sensibilidade, reprodutibilidade, acurácia e velocidade na análise (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

Utilizamos como método de detecção o *Taqman probes* (*Applied Biosystems*), que possui uma sonda cuja extremidade 5' é marcada com um fluoróforo (FAM) e a extremidade 3' com um supressor (3IABkFQ). O fluoróforo é excitado pelo termociclador e transfere sua energia para o supressor, por isso, FAM não emite fluorescência enquanto estiver transportando energia para o supressor. A sonda liga-se ao *amplicon* durante cada etapa de anelamento da PCR. Conforme vai avançando a polimerização, catalisada pela enzima Taq polimerase, a sonda é degradada pela atividade exonuclease desta enzima. Esse processo libera o fluoróforo e o supressor na solução, o que finaliza a transferência de energia de FAM para 3IABkFQ, levando a um aumento na emissão de fluorescência de FAM, que é detectado pelo termociclador. Assim, a fluorescência da amostra será proporcional ao número de *amplicons* que foram criados (FIGURA 7).

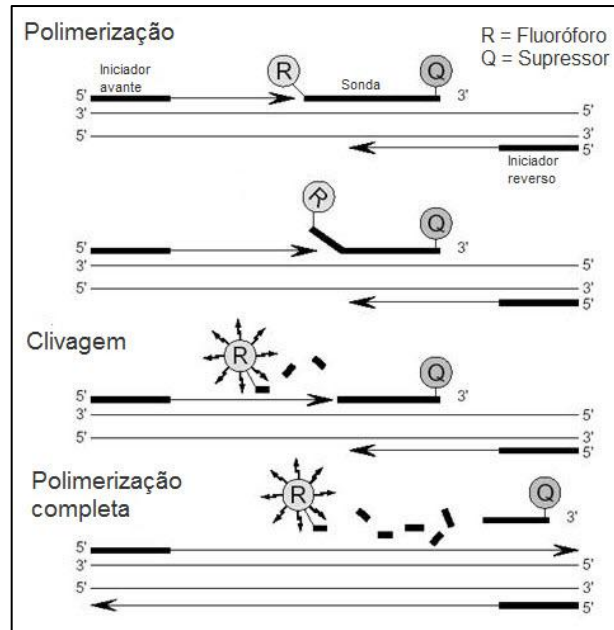


Figura 7 – Esquema do sistema de detecção Taqman utilizando sondas marcadas com fluorescentes. FONTE: www.appliedbiosystems.com. Tradução da autora.

Condições das reações e montagem das placas

A qPCR foi realizada no equipamento *Mastercycler ep realplex2* da *Eppendorf*, em placas de 96 poços (PCR-96-AB-C, *Axigen*).

Cada gene foi quantificado separadamente, em placas contendo 13 amostras de DNA de tumor e de sangue, um controle negativo (água ultra-pura) e uma curva padrão com 5 pontos de diluição de fator 4, todos em triplicata (FIGURA 8).

Cada reação tem um volume final de 10 μ l/poço, sendo composto por: 2 μ l amostra (no caso do controle negativo é água); 0,5 de solução de oligonucleotídeos iniciadores e sondas (nas concentrações de 500 nM e 250nM respectivamente), 5 μ l de *Quantifast Probe PCR +ROX Master Mix* (*Qiagen*) e 2,5 μ l de água ultra-pura.

As etapas de amplificação possuem um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C, por 1 minuto. A fluorescência é medida ao final de cada fase de extensão.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP 256	CP 256	CP 256	2S	2S	2S	6S	6S	6S	10S	10S	10S
B	CP 64	CP 64	CP 64	2T	2T	2T	6T	6T	6T	10T	10T	10T
C	CP 16	CP 16	CP 16	3S	3S	3S	7S	7S	7S	11S	11S	11S
D	CP 4	CP 4	CP 4	3T	3T	3T	7T	7T	7T	11T	11T	11T
E	CP 1	CP 1	CP 1	4S	4S	4S	8S	8S	8S	12S	12S	12S
F	NTC	NTC	NTC	4T	4T	4T	8T	8T	8T	12T	12T	12T
G	1S	1S	1S	5S	5S	5S	9S	9S	9S	13S	13S	13S
H	1T	1T	1T	5T	5T	5T	9T	9T	9T	13T	13T	13T

Figura 8 – Esquema da placa de 96 poços contendo uma curva padrão, em vermelho; 13 amostras de sangue (S) e tumor (T), em azul; e o controle negativo, em preto.

Oligonucleotídeos iniciadores

A tabela 2 traz as sequências dos iniciadores e das sondas dos genes alvo *BCHE*, *ACHE*, *MME* e *EPHB4* e dos genes de referência, homólogo do pumílio 1 de *Drosophila* (*PUM1*), *18S* e β -Actina (*ACTB*). Estes foram utilizados como controles endógenos por terem seus níveis de amplificação e expressão inalterados em tecidos tumorais, (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000; BLANQUICETT *et al.*, 2002; LYNG *et al.*, 2008; MORSE *et al.*, 2005). Todos os iniciadores e sondas foram projetados pela ferramenta *IDT SciTools Real Time PCR*.

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados na qPCR.

Gene	Exon	Iniciador avante	Sonda	Iniciador reverso
<i>18S</i>		5' GAGACTCTGGCATGCTAACTAG 3'	5' TGCTCAATCTCGGGTGGCTGAA 3'	5' GGACATCTAAGGGCATCACAG 3'
<i>ACHE</i>	2	5' CACCCTATACCCAGGTTTTGAG 3'	5' AGATGTGGAACCCCAACCGTGAG 3'	5' CCCCATAGATCCAGACGAGG 3'
<i>ACTB</i>	6	5' AGTCCCTTGCCATCCTAAAAG 3'	5' CCAGTCCTCTCCCAAGTCCACAC 3'	5' CAATGCTATCACCTCCCCTG 3'
<i>BCHE</i>	2	5' AGGATTCTTAGCTTTGCCAGG 3'	5' AAACCCATGTTCCCTGGAGCCT 3'	5' AACCCACTGAAGAGCCAAC 3'
<i>EPHB4</i>	6	5' GAGACCTGACTTTTGACCCC 3'	5' CAGGACGTAGCCCTCGAACCAC 3'	5' AGGATACCCCGTTCAATGC 3'
<i>MME</i>	4	5' GCTCGACTGATCCAAAACATG 3'	5' CCACCACTGAGCCTTGACAGACTTT 3'	5' GACATTACGTTTCAACCAGCC 3'
<i>PUM1</i>	15	5' ACGAATGGCAGTGGAAGATAC 3'	5' TGAAGCCAAGTACCGCAGTGCAA 3'	5' CGAGAGGAAGAGAAAAGAGTGC 3'

Quantificação relativa pelo método da curva padrão

A quantificação relativa é determinada pela relação entre a quantidade do gene alvo e a dos controles endógenos (genes de referência). Os cálculos baseiam-se na comparação dos Cts (*Cycle threshold*), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação exponencial alcança intensidade fluorescente superior ao limiar de detecção (*threshold*).

O método da Curva Padrão compara dados obtidos em uma diluição padrão de concentração conhecida com os das amostras estudadas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004; LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005; DORAK, 2006). No presente estudo, fizemos uma diluição seriada de razão 4 (256 ng/μl, 64ng/μl, 16ng/μl, 4ng/μl e 1ng/μl) de uma amostra qualquer com concentração conhecida (FIGURA 9). Vale ressaltar que foi utilizada sempre a mesma amostra para constituir a curva padrão.

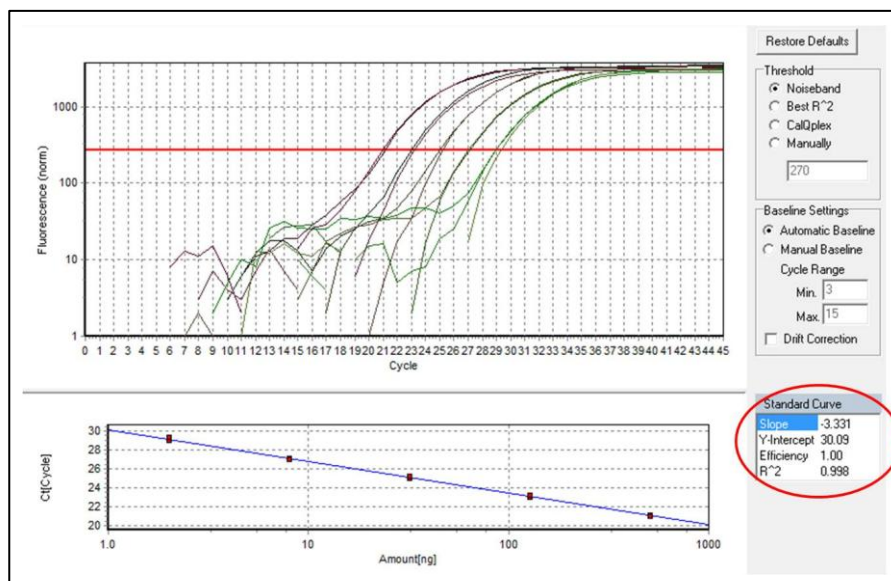


Figura 9 – Curva padrão com cinco pontos de diluição, no detalhe, valores referentes de eficiência. Imagem gerada pelo *software Realplex* e modificada pela autora.

Em seguida, relacionam-se os Cts dos pontos dessa diluição seriada com os Cts das amostras que estão sendo investigadas, podendo-se inferir a quantidade de DNA (em ng) que estas últimas contêm: se uma amostra tiver um Ct equivalente ao de algum ponto da curva de diluição significa que ela contém a mesma quantidade de DNA que este determinado ponto representa (FIGURA 10).

Foram consideradas somente as corridas de qPCR cuja curva padrão tivesse uma eficiência da reação (E) de 100%. Para obter essa eficiência, outro fator, o *slope*

(inclinação da curva), deve ser levado em conta, O *slope* é empregado na fórmula da eficiência, sendo: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Uma curva padrão é graficamente representada como uma regressão linear semi-log de CT vs. quantidade de ácido nucleico.

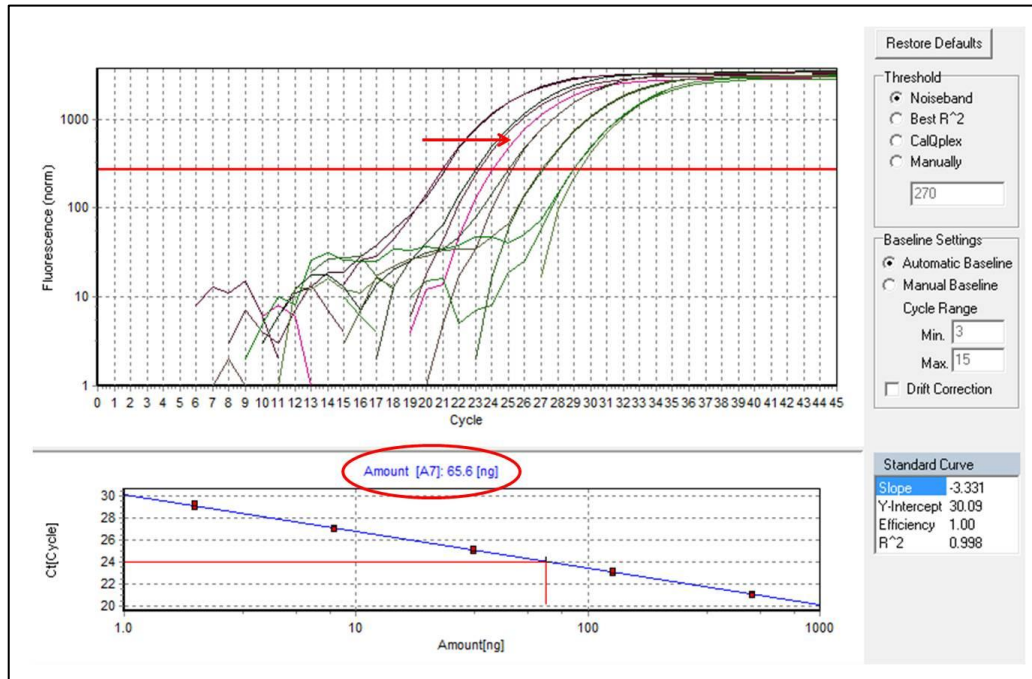


Figura 10 – Amostra quantificada (em ng) em relação à curva padrão. Imagem gerada pelo *software Realplex* e modificada pela autora.

Outros parâmetros auxiliam a nortear a obtenção de uma exímia reação, como o R_2 (coeficiente de correlação) e *y-intercept*, que também são fornecidos pelo próprio *software*. O R_2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras da curva padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). Valores de R_2 inferiores a 0,99 podem indicar problemas de pipetagem nas triplicatas das amostras e dessa forma a precisão dos resultados pode ser questionável. O *y-intercept* indica o valor esperado de Ct para uma amostra com quantidade 1 (por exemplo 1ng/ μ l) (FIGURA 7) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006; APPLIED BIOSYSTEMS, 2008; EUROGENTEC).

Análise dos dados – o valor de Q

Para cada amostra foi obtido a quantidade dos genes alvo (*BCHE*, *ACHE*, *MME* e *EPHB4*) e dos genes de referência (*18S*, *PUM1* e *ACTB*) tanto em tecido tumoral quanto no tecido sanguíneo, na reação de qPCR pelo *Software Realplex 1.5 Eppendorf*. Em

seguida, é calculada a relação (Q) entre as médias dessas quantidades nos genes alvo e referência nos dois tecidos, utilizando-se a seguinte fórmula (KÖNIGSHOFF *et al.*, 2003):

$$Q = \frac{\textit{Tumor}_{ALVO} / \textit{Tumor}_{REFERÊNCIA}}{\textit{Sangue}_{ALVO} / \textit{Sangue}_{REFERÊNCIA}}$$

Com os coeficientes de variação (CV) obtidos das triplicatas dos tumores de cada gene alvo e também dos tumores dos genes de referência, será obtido o desvio padrão (S) de Q, da seguinte maneira (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008):

$$CV_1 = \frac{\textit{Desvio Padrão Tumor}_{ALVO}}{\textit{Média Tumor}_{ALVO}}$$

$$CV_2 = \frac{\textit{Desvio Padrão Tumor}_{REFERÊNCIA}}{\textit{Média Tumor}_{REFERÊNCIA}}$$

$$CV = (CV_1^2 + CV_2^2)^{1/2}$$

E, finalmente:

$$S = CV \times Q$$

Dessa forma determinaremos, em valores relativos, a comparação entre a quantidade de cópias dos genes no sangue e no tumor de uma mesma paciente. Se a quantidade dos genes alvo estiver aumentada no tecido tumoral o valor obtido com esta fórmula será > 1; se não tiver sofrido alteração será = 1, e se estiver deletado será < 1. Desse valor, inferimos se o gene está ou não amplificado (presente em um maior número de cópias) ou deletado no tecido tumoral.

Análise estatística

O programa estatístico BioEstat 5.0 (2007) foi empregado na realização dos testes de Correlação de *Spearman* e de Regressão. A Correlação foi feita entre os dados obtidos dos valores de Q dos genes próximos (*ACHE – EPHB4*, *BCHE – MME*) e a Regressão entre os valores de Q dos quatro genes e dos parâmetros histopatológicos das pacientes.

APÊNDICE II

Material e Métodos da análise de expressão

Caracterização da amostra

Essa etapa do estudo também foi realizada com amostras gentilmente cedidas pela equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, UFPR, de pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba (PR), sendo essas amostras:

- 1) RNA de fragmentos de tumores de mama;
- 2) RNA de fragmentos de tecido mamário normal, utilizados como controle.

A amostra de tecido tumoral foi composta por 45 pacientes, cuja idade média era de $57,8 \pm 15,9$ anos (32 – 89 anos). Infelizmente não foi possível obter informações sobre os dados histopatológicos de todas as pacientes, por isso a tabela 3 apresenta um número variável de esclarecimentos sobre esses parâmetros. O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal invasor (66,7%), contudo, nessa classe foram incluídos amostras de carcinoma ductal invasor associado a outro subtipo de carcinoma, a fim de possibilitar as análises estatísticas.

Em relação à classificação patológica do estadiamento TNM para tumores malignos, apenas 28% das amostras possuíam alguma informação. Estando 2 amostras no estágio I, 6 no estágio IIA, 4 no estágio IIIA, e 1 no estágio IIIB. Outro fator de prognóstico é o marcador de proliferação celular Ki-67, cuja porcentagem de células positivas é usada para estratificar pacientes em bom e mau prognóstico. Mas novamente, poucas amostras (22%) possuíam tal informação: 3 amostras com 5% positivas, 2 com 10%, 3 com 20%, 2 com 60%. Devido a pouca quantidade de informação, esses parâmetros foram excluídos das análises estatísticas.

A amostra de tecido mamário normal é composta por fragmentos de tecidos adjacentes ao tumor, retirados do quadrante oposto a este, respeitando a margem de segurança.

Processamento da amostra

Extração de RNA do tumor

Para esse procedimento utilizamos o kit *RNeasy*[®] (*Qiagen*). A partir de amostras de tecido tumoral, previamente processadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, é realizado o procedimento de homogeneização de 30 mg de amostra juntamente com 600 µL de tampão RLT, com homogeneizador elétrico, até ser obtido um extrato. Após centrifugação em velocidade máxima em microcentrífuga por 3 minutos adicionamos 1 volume de etanol 70%. Transfere-se 700 µL da amostra para tubos específicos do kit, compostos de coluna *spin* e tubo coletor de 2,0 mL. Esses tubos são centrifugados por 15 segundos a ≥ 10.000 rpm (≥ 8.000 xg).

Tabela 3 – Informações histopatológicas das pacientes

Parâmetros	N (%)
Tipo histológico	
Carcinoma Ductal	30/40 (66,7)
Carcinoma Lobular	2/40 (4,4)
Carcinoma Misto	3/40 (6,7)
Outros tipos	5/40 (11,1)
Tamanho do tumor (mm)	
5 – 24	19/41 (42,2)
25 – 44	16/41 (35,6)
45 – 64	4/41 (8,9)
65 – 84	2/41 (4,4)
Grau do tumor	
I	7/40 (15,6)
II	24/40 (53,3)
III	9/40 (20)
Metástase em linfonodos	
Presente	18/37 (40)
Ausente	19/37 (42,2)
Amplificação do <i>HER2</i>	
Positivo	8/38 (17,8)
Negativo	30/38 (66,7)
Receptor de Estrogênio	
Positivo	33/40 (73,3)
Negativo	7/40 (15,6)
Receptor de Progesterona	
Positivo	33/40 (73,3)
Negativo	7/40 (15,6)

Fonte: A autora (2012)

O conteúdo do tubo coletor é descartado e o tubo pode ser reutilizado. Adicionam-se 700 µL de tampão RW1 e repete-se o procedimento de centrifugação e descarte anterior. Adicionar 500 µL de tampão RPE e repetir o procedimento de centrifugação e descarte anterior. Adicionar novamente 500 µL de tampão RPE e centrifugar por 2 minutos à ≥ 10.000 rpm (≥ 8.000 xg). O tubo coletor é descartado com o conteúdo e um novo tubo coletor utilizado. Centrifugar a velocidade máxima por 1 minuto, então o tubo coletor deve ser descartado juntamente com o conteúdo. Um novo tubo coletor é utilizado e adicionar de 30 a 50 µL de água livre de RNase. Centrifugar novamente por 1 minuto a ≥ 10.000 rpm (≥ 8.000 xg). O conteúdo do tubo coletor é transferido para um microtubo de armazenamento identificado para então proceder a leitura de concentração de RNA.

As concentrações de RNA obtidas pela extração são determinadas utilizando o aparelho Nano Drop 1000. A partir delas, as soluções de trabalho de RNA serão preparadas com 50,0 ng/µL.

Produção do cDNA

A reação de retrotranscrição foi realizada segundo kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante. São adicionados ao RNA: tampão *RT Buffer* (10x), *dNTPs Mix* (25x), *RT Random Primers* (10x), enzima transcriptase reversa *MultiScribe*[®] (50 U/µL) e água livre de RNase. Em seguida, a amostra é levada ao termociclador e submetida ao ciclo de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 segundos. Ao final da reação o cDNA é estocado em freezer a -20°C. A concentração do cDNA de uso foi padronizada em 7,5ng/ µL.

Condições das reações e montagem das placas

Para essa parte do trabalho utilizamos os kits para expressão *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay* da *Applied Biosystems* e a reação de qPCR foi realizada no equipamento *Mastercycler ep realplex4* da *Eppendorf*, em placas de 96 poços (PCR-96-AB-C, *Axigen*).

Cada placa continha 3 amostras de cDNA a serem amplificadas por todos os 4 genes alvo e os 3 genes de referência, um controle negativo (água ultra pura) e um positivo. Todas as reações feitas em triplicatas, com exceção do controle negativo

(FIGURA 11). O controle positivo, nesse caso, serve como um controle entre placas, feito sempre com a mesma amostra, para todos os ensaios, a fim de assegurar que as reações entre as placas são homogêneas.

A reação possui um volume final de 10 μ l/poço, sendo composta por:

- 2 μ l amostra (ou água ultra-pura para o controle negativo);
- 0,5 de solução de oligonucleotídeos iniciadores e sondas (nas concentrações de 18 μ M e 5 μ M respectivamente),
- 5 μ l de *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*
- 2,5 μ l de água ultra-pura para completar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACHE 1	ACHE 1	ACHE 1	MME 1	MME 1	MME 1	EPHB4 1	EPHB4 1	EPHB4 1	BCHE 1	BCHE 1	BCHE 1
B	ACHE 2	ACHE 2	ACHE 2	MME 2	MME 2	MME 2	EPHB4 2	EPHB4 2	EPHB4 2	BCHE 2	BCHE 2	BCHE 2
C	ACHE 3	ACHE 3	ACHE 3	MME 3	MME 3	MME 3	EPHB4 3	EPHB4 3	EPHB4 3	BCHE 3	BCHE 3	BCHE 3
D	ACTB 1	ACTB 1	ACTB 1	18S 1	NTC ACHE	NTC PUM1			NTC BCHE	18S 3	18S 3	18S 3
E	ACTB 2	ACTB 2	ACTB 2	18S 1	NTC MME	NTC ACTB				PUM1 1	PUM1 1	PUM1 1
F	ACTB 3	ACTB 3	ACTB 3	18S 1	NTC EPHB4	NTC 18S	18S 2	18S 2	18S 2	PUM1 2	PUM1 2	PUM1 2
G	+ ACHE	+ ACHE	+ ACHE	+ MME	+ MME	+ MME	+ EPHB4	+ EPHB4	+ EPHB4	PUM1 3	PUM1 3	PUM1 3
H	+ PUM1	+ PUM1	+ PUM1	+ ACTB	+ ACTB	+ ACTB	+ 18S	+ 18S	+ 18S	+ BCHE	+ BCHE	+ BCHE

Figura 11 – Esquema da placa de 96 poços contendo 3 reações dos genes alvo (em azul) e dos genes de referência (em vermelho), o controle positivo (em verde) e o controle negativo (em preto). Os poços preenchidos em cinza não puderam ser utilizados.

Conforme indicado pela *Applied Biosystems*, as etapas do ciclo de amplificação foram:

- temperatura inicial de ativação de 50°C por 2 minutos;
- temperatura de desnaturação a 95°C por 10 minutos;
- 40 ciclos constituídos de: 95°C (desnaturação) por 15 segundos e 60°C (anelamento dos iniciadores e da sonda) por 1 minuto.

Foram mantidos os mesmo genes de referência escolhidos para o estudo de alteração do número de cópias: β -actina (*ACTB*), RNA ribossomal 1 (*18S*) e homólogo do pumílio 1 de *Drosophila* (*PUM1*). Estes foram submetidos ao teste de estabilidade, realizado pelo *software DataAssist®* v3.01. O resultado pode ser visto na figura 12. Quanto menor for o valor atribuído ao gene, mais estável ele é. Foi possível utilizar os

três, pois receberam valores menores que 1 (0,5678; 0,4548; 0,3841; respectivamente) (DATAASSIST SOFTWARE USER INSTRUCTIONS).

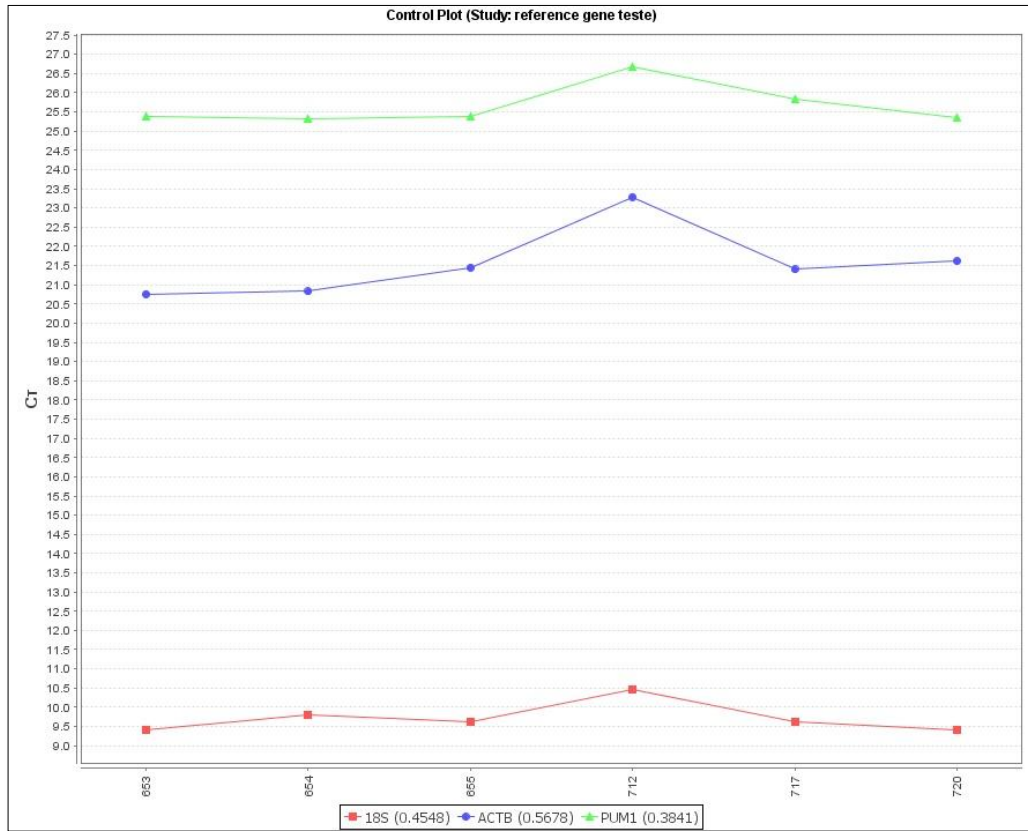


Figura 12 – Teste de estabilidade dos genes de referência *ACTB*, *18S* e *PUM1*. Valores dos escores 18S: 0.4548, ACTB: 0.5678, PUM1: 0.3841. FONTE: *software DataAssist*® (2012)

Quantificação relativa pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para quantificar os níveis de expressão relativa dos genes *ACHE*, *BCHE*, *MME* E *EPHB4*, optou-se pelo método do Ct comparativo, que no presente estudo descreve a mudança na expressão desses genes em um grupo de amostra de tumor, normalizada pelos genes de referência, e comparada com um grupo calibrador de amostras de tecido não tumoral (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Segue a fórmula:

$$2^{-(Ct_{AT} - Ct_{RT}) - (Ct_{AN} - Ct_{RN})}$$

Sendo que AT representa o Ct do gene alvo no tecido tumoral, RT o Ct do gene referência no tecido tumoral, NA o Ct do gene alvo no tecido normal e RN o Ct do gene

referência no tecido normal. O valor obtido da quantificação da expressão relativa (chamado de *fold change*, ou abreviado em FC) indica quantas vezes esse gene está mais expresso (> 1), inalterado ($= 1$), ou menos expresso (< 1).

Como três genes de referência foram empregados, uma média de seus Cts foi usada na fórmula.

Análises Estatísticas

Foram realizadas Correlações de Spearman entre a quantificação de expressão relativa (*Fold Change* - FC) dos grupos de genes próximos (*ACHE – EPHB4*, *BCHE – MME*), e também entre o FC e os valores de Q (obtidos na análise de alteração do número de cópias) de cada gene separadamente, para um subconjunto de amostras (N=25) que foi possível incluir nas duas etapas do estudo. A diferença entre as médias de FC dos genes *ACHE – BCHE* e *EPHB4 – MME* foi analisada pelo teste *t* de *Student*. Teste esse também utilizado para comparar os perfis de expressão entre os tecidos normal e tumoral em cada gene. Foram feitas também regressões entre o FC de cada gene com os dados histopatológicos das pacientes. Todas essas análises foram efetuadas pelo programa *SPSS Statistics 17.0*.

APÊNDICE III

RESULTADO DETALHADO

Análise da alteração do número de cópias

Todas as amostras analisadas das pacientes apresentaram algum tipo de alteração. Para os genes *ACHE* e *EPHB4* foi observado uma tendência à amplificação (62,5% vs. 37,5%; $p > 0,1$; e 53,13% vs. 46,88%; $p > 0,5$; respectivamente) e à deleção para os genes *BCHE* e *MME* (56,25% vs. 43,75% em ambos; $p > 0,5$) (FIGURAS 13 e 14).

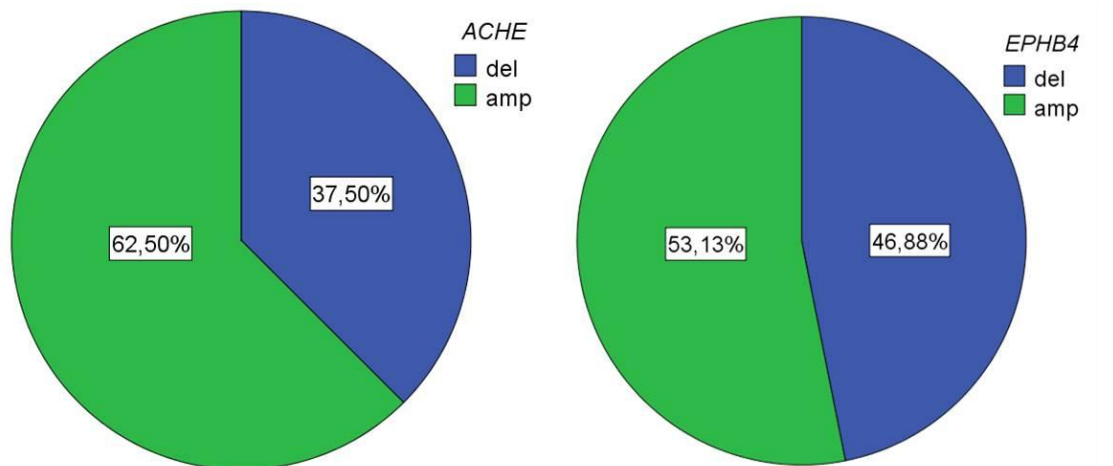


Figura 13 – Gráfico mostrando alterações (%) sofridas pelos genes *ACHE* e *EPHB4*. FONTE: Bioestat 5.0

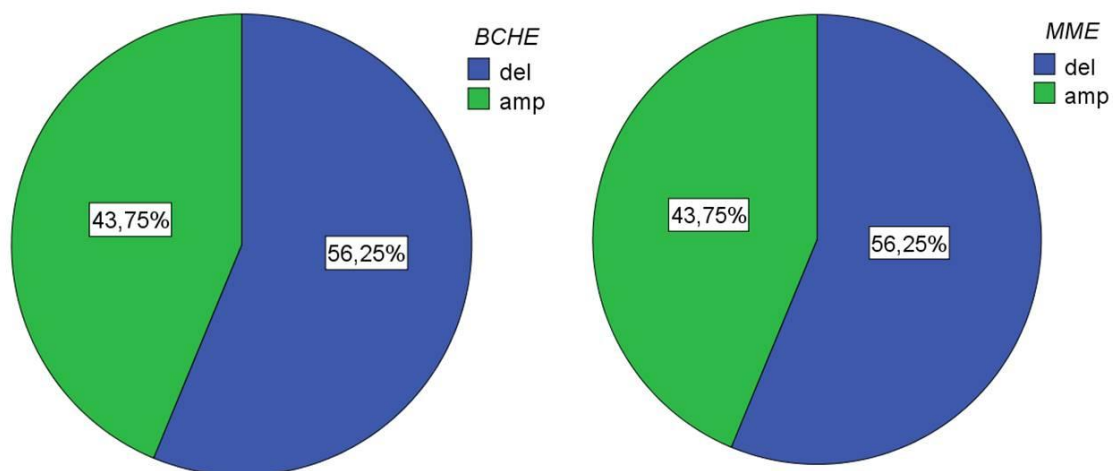


Figura 14 – Gráfico mostrando alterações (%) sofridas pelos genes *BCHE* e *MME*. FONTE: Bioestat 5.0

Por meio do teste de correlação de Spearman, obtivemos uma correlação positiva entre os valores de Q dos genes *ACHE* e *EPHB4* ($r_s = 0.5948$; $p = 0.0004$) e entre *BCHE* e *MME* ($r_s = 0.3581$; $p = 0.0478$). (FIGURA 15)

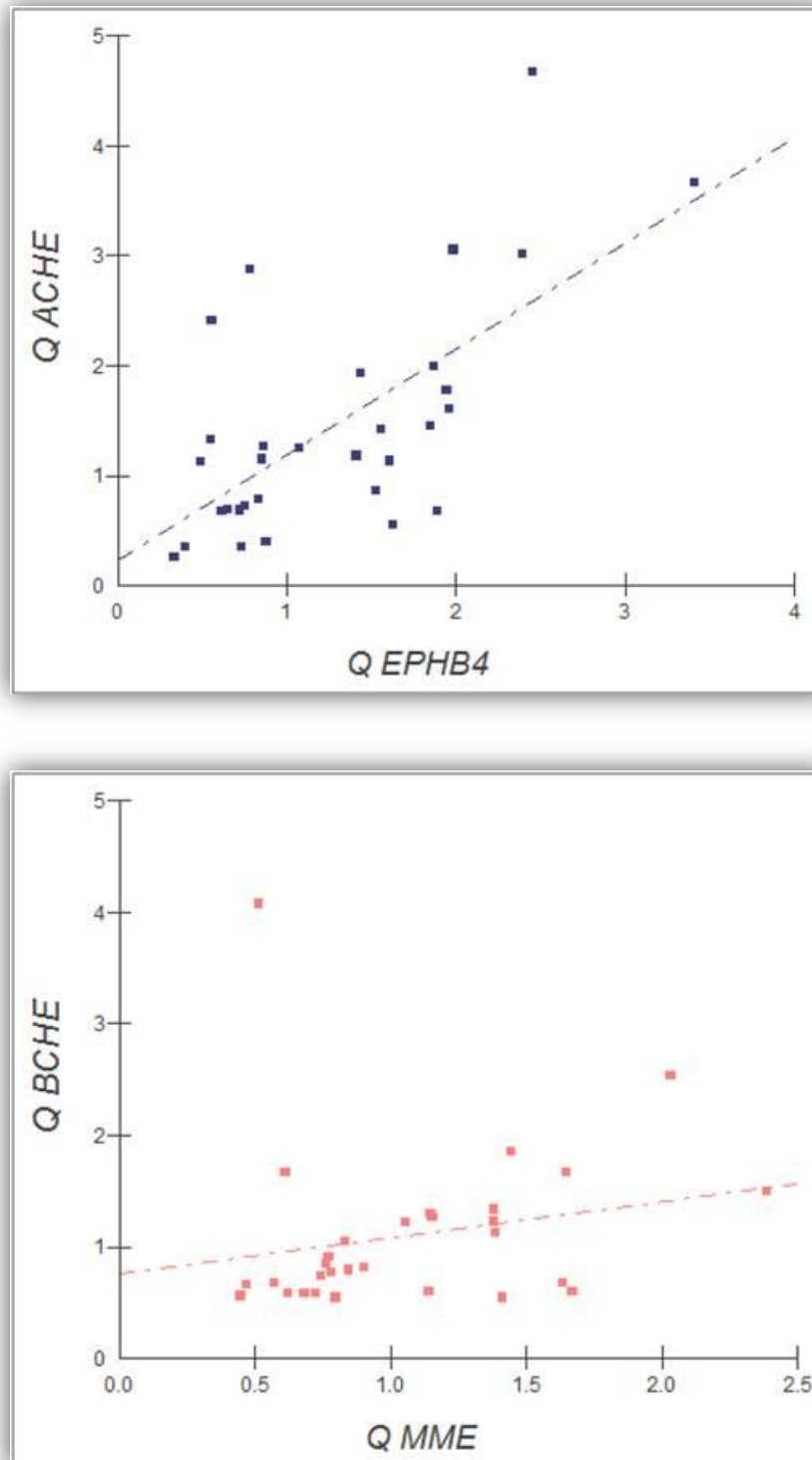


Figura 15 – Gráficos mostrando correlação positiva entre os valores de Q dos genes da região 7q22 (*ACHE-EPHB4*) acima e os genes da região 3q26 (*BCHE-MME*) abaixo. FONTE: Bioestat 5.0

Testes de regressão logística foram feitos para avaliar se as alterações no número de cópias estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do carcinoma mamário, utilizando dados das características histopatológicas como: o tamanho do tumor, grau histológico, tipo histológico, metástase no linfonodo, presença ou ausência de receptores de estrogênio, progesterona e amplificação do *HER2*. Nenhum dos valores obtidos foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$).

Análise de expressão

Foi possível obter um perfil de expressão relativa das 45 amostras de carcinoma mamário dos quatro genes em questão (FIGURA 19 e 20). Os genes *BCHE* e *MME* apresentaram alteração em todas as amostras, com uma significativa maioria estando menos expressa quando comparada com as amostras mais expressas (95,6% vs 4,4%; $p < 0,001$; em ambos) (FIGURA 16). Já nos genes *ACHE* e *EPHB4* algumas amostras não tiveram sua expressão alterada (4,4% e 11,1%; respectivamente), e foi observado um resultado semelhante entre as amostras mais expressas e as menos expressas (*ACHE*: 37,8% vs 57,8%; $p = 0,170$) (*EPHB4*: 46,4% vs 42,2%; $p=0,752$) (FIGURA 11). Uma correlação positiva entre o FC dos genes *BCHE* e *MME* foi obtida (r_s 0,495; $p = 0,001$) (FIGURA 18). Essa correlação não ocorre entre os genes *ACHE* e *EPHB4* (r_s - 0,04; $p = 0,792$).

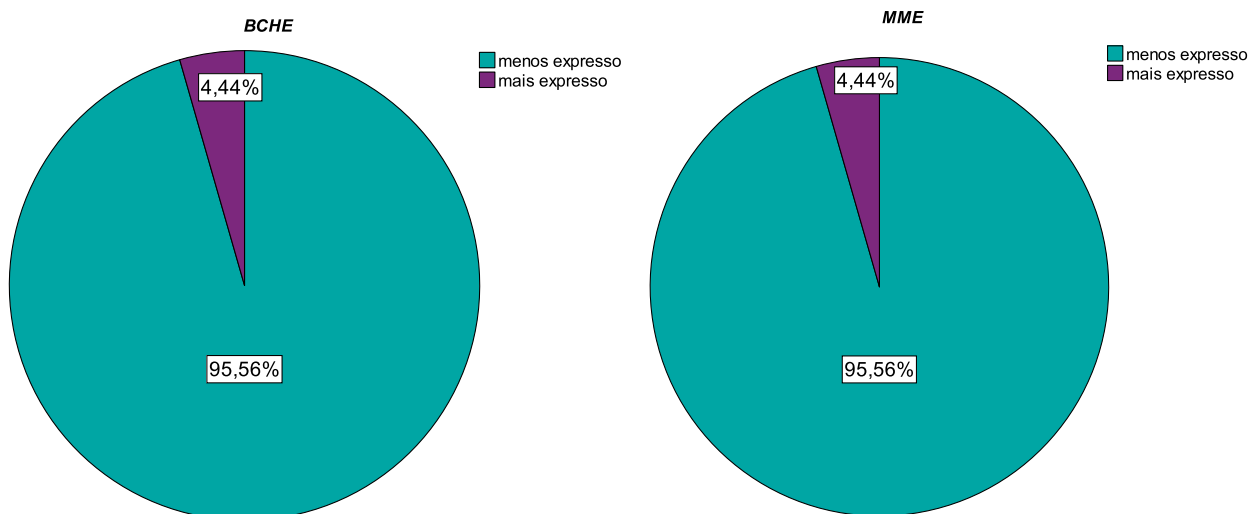


Figura 16 – Gráficos mostrando as alterações na expressão (%) dos genes *BCHE* e *MME*. FONTE: SPSS Statistics 17.0

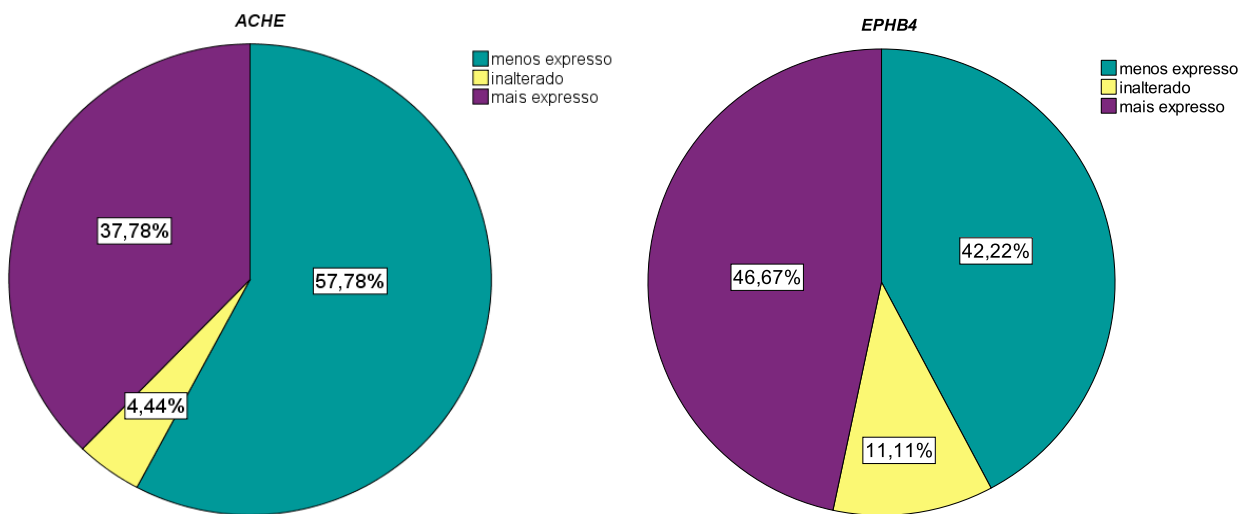


Figura 17 – Gráficos mostrando a alterações na expressão (%) dos genes *ACHE* e *EPHB4*. FONTE: SPSS Statistics 17.0

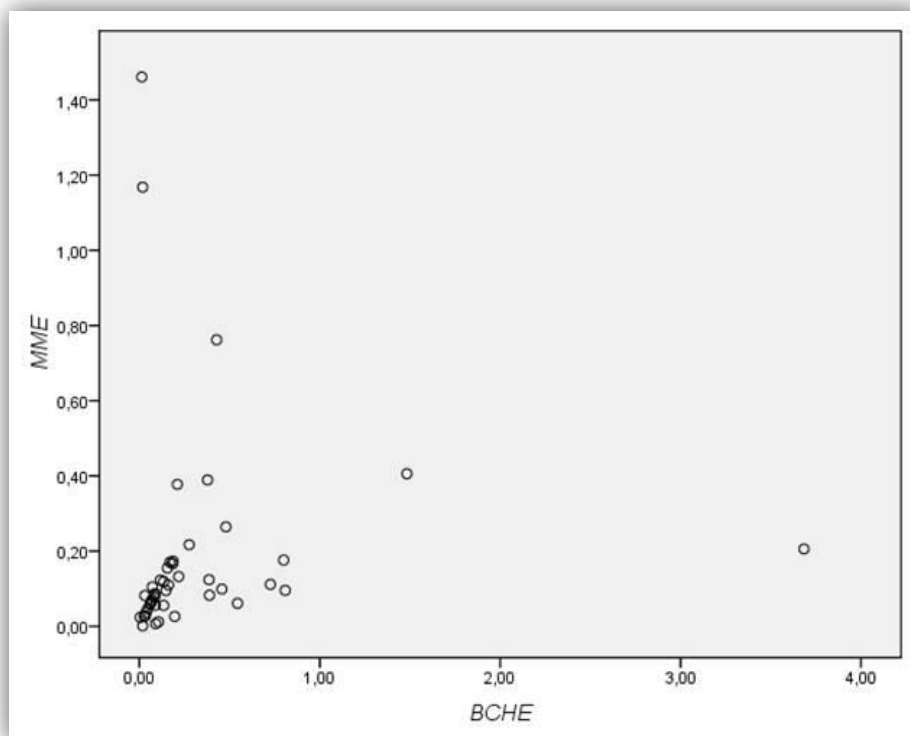


Figura 18 – Gráfico de correlação entre os valores de expressão relativa dos genes *BCHE* e *MME* (r_s 0,495; $p = 0,001$) FONTE: SPSS Statistics 17.0

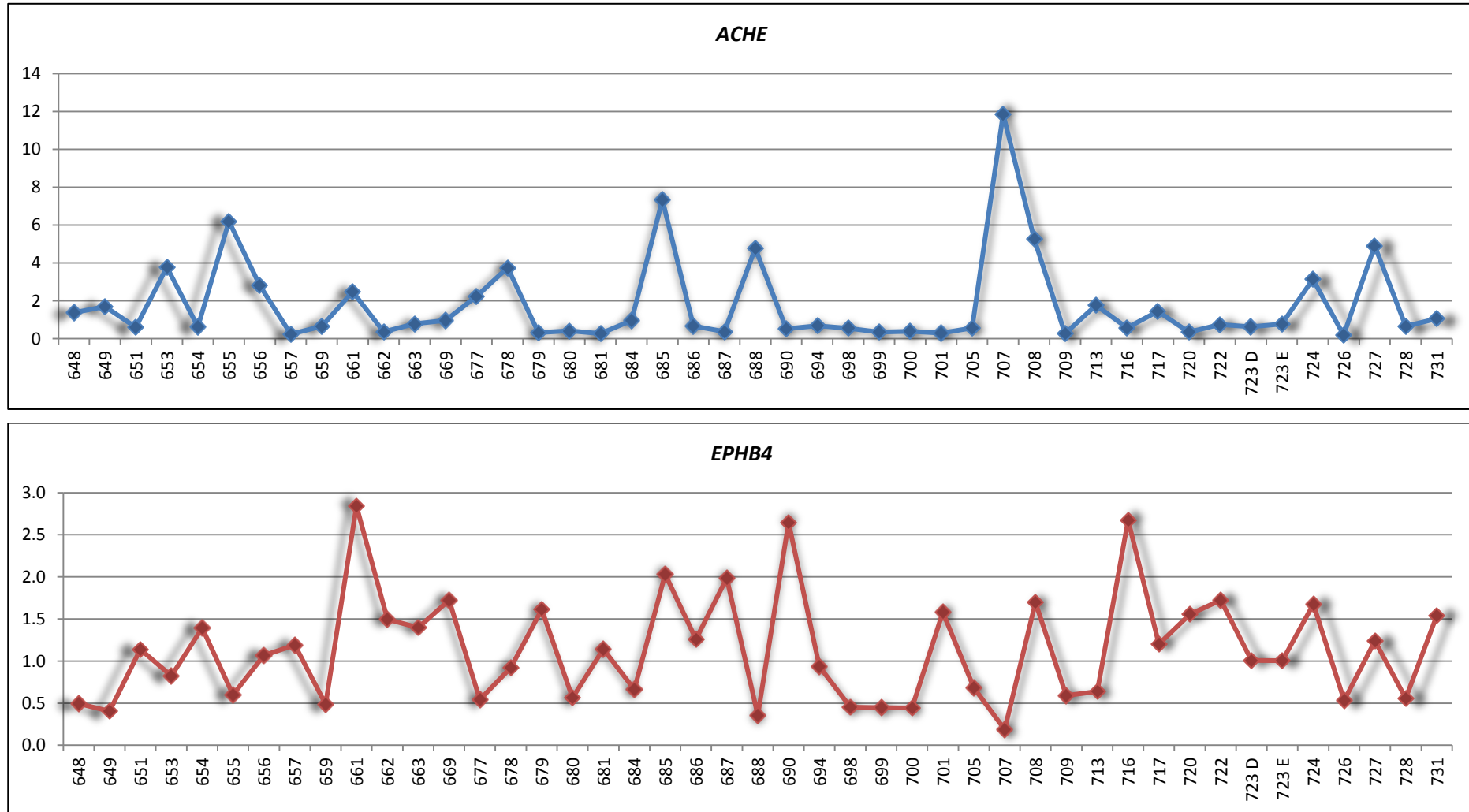


Figura 19 – Fold Change de cada amostra para os genes ACHE e EPHB4, no tecido tumoral.

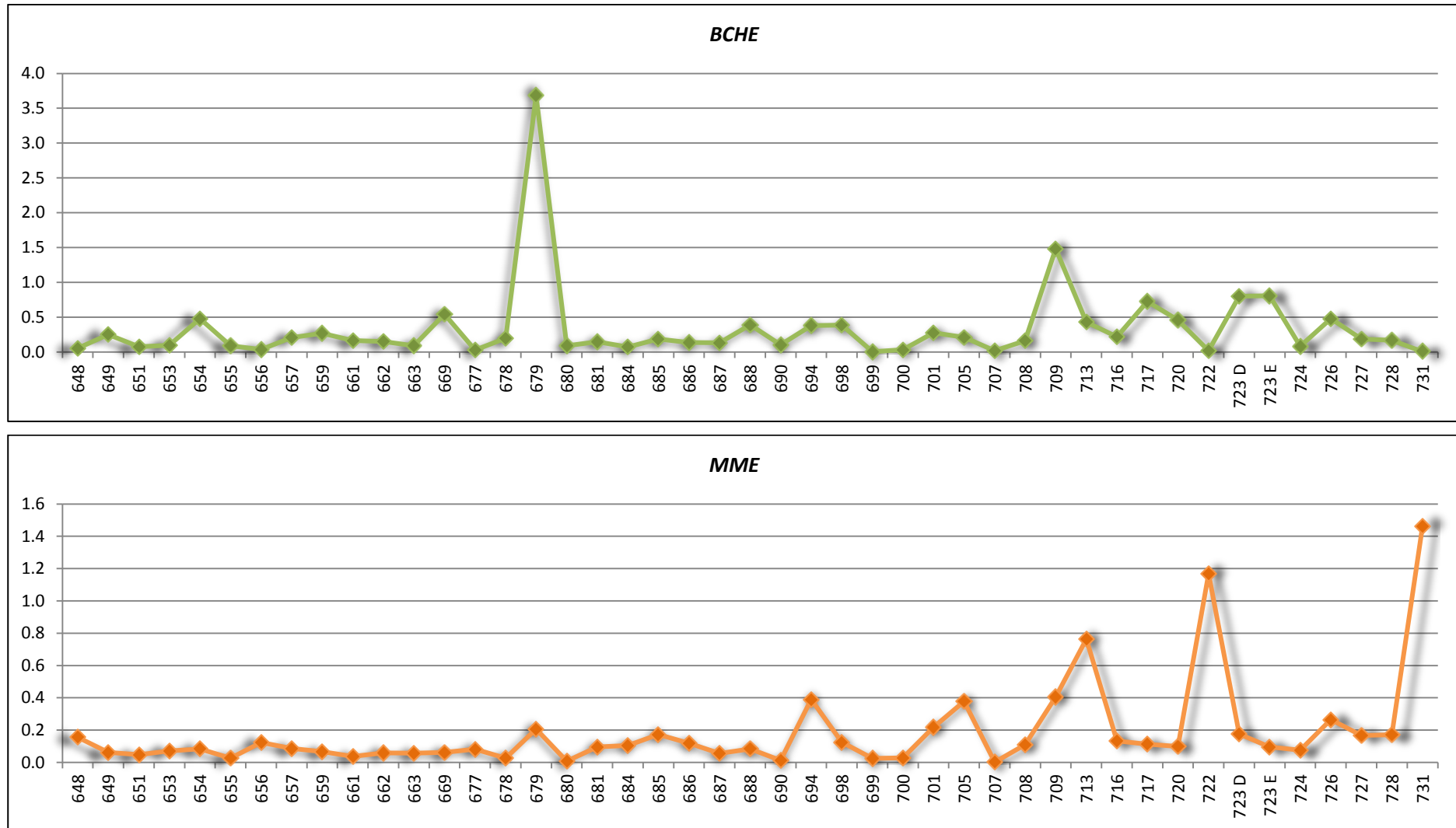


Figura 20 – Fold Change de cada amostra para os genes *BCHE* e *MME*, no tecido tumoral.

A tabela 4 apresenta os valores de comparação entre as médias de expressão das amostras de tecido tumoral e das amostras de tecido normal, para cada gene separadamente, a fim de visualizar o comportamento de expressão em cada tecido. Apesar do tamanho da amostra de tecido normal ser consideravelmente menor ($n = 8$) o teste é informativo. Para os genes *ACHE*, *BCHE* e *MME*, o perfil de expressão entre os dois tecidos é significativamente diferente, no entanto, para o gene *EPHB4* essa diferença não existe, ou seja sua expressão encontra-se igualmente alterada em ambos os tecidos. A figura 21 traz a porcentagem de amostras com expressão alteradas nos dois tecidos, para cada gene.

Tabela 4 – Parâmetros do valor de quantificação da expressão relativa (FC) das 45 amostras de tecido tumoral e das 8 amostras de tecido normal, e seus respectivos valores de t e p .

GENE	FC TECIDO TUMORAL			FC TECIDO NORMAL			$t(p)$
	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	
<i>ACHE</i>	0,1968	11,861	1,7955 \pm 2,3356	0,7098	1,6967	1,0439 \pm 0,3266	-2,047 (0,046)
<i>EPHB4</i>	0,1882	2,843	1,1377 \pm 0,6503	0,6096	1,5171	1,0623 \pm 0,3719	-0,317 (0,752)
<i>BCHE</i>	0,0049	3,684	0,3336 \pm 0,5811	0,3846	2,7936	1,2357 \pm 0,8604	2,852 (0,021)
<i>MME</i>	0,0013	1,461	0,1835 \pm 0,2827	0,4417	2,0704	1,1217 \pm 0,5719	4,543 (0,002)

Com o intuito de verificar se as alterações no número de cópias poderiam ter alguma relação direta com as alterações na expressão, foi feito o teste de correlação entre o valor de Q e FC de cada gene (FC *ACHE* x Q *ACHE*; FC *EPHB4* x Q *EPHB4*; FC *BCHE* x Q *BCHE*; FC *MME* x Q *MME*), no entanto não foi encontrada nenhuma correlação: $p = 0,146$; $p = 0,357$; $p = 0,089$; $p = 0,161$; respectivamente.

Na análise de regressão, os valores de expressão relativa (FC) de cada gene foram colocados como variável independente, e as variáveis dependentes foram: metástase nos linfonodos, amplificação do gene *HER2*, receptor de estrogênio e receptor de progesterona na regressão binária; tipo histológico na regressão multinomial; grau do tumor e tamanho do tumor na regressão ordinal. Nenhuma dessas análises apresentou valores significativos ($p > 0,05$).

Analisando o comportamento isolado dos genes *ACHE* e *BCHE*, observamos que a média de expressão do gene *ACHE* é de 5,5 vezes maior que a do gene *BCHE* ($t = 4,075$; $p < 0,001$).

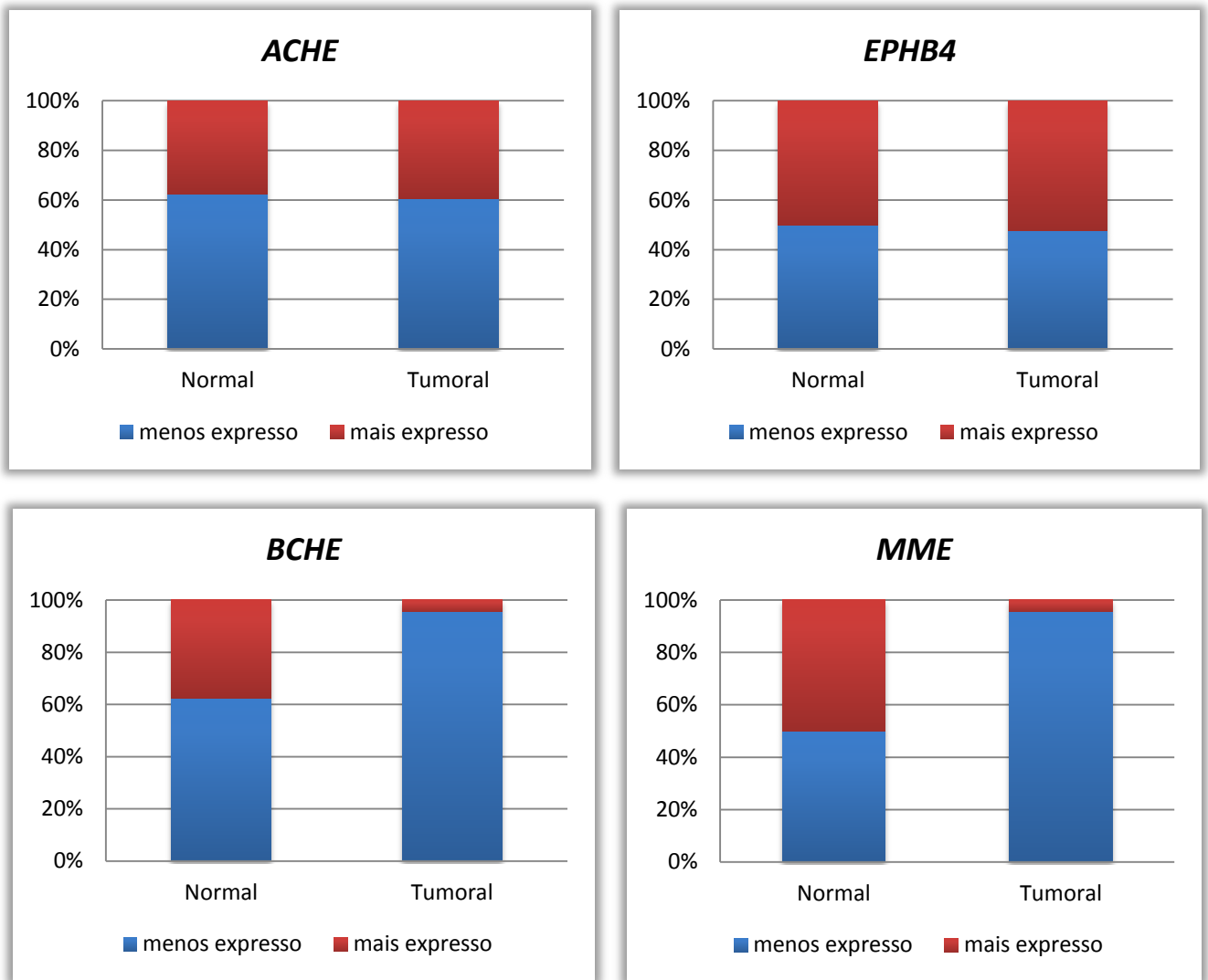


Figura 21 – Porcentagem das amostras alteradas (mais expressas e menos expressas) no tecido tumoral e tecido normal. Para os genes *ACHE* e *EPHB4* os indivíduos inalterados foram excluídos.