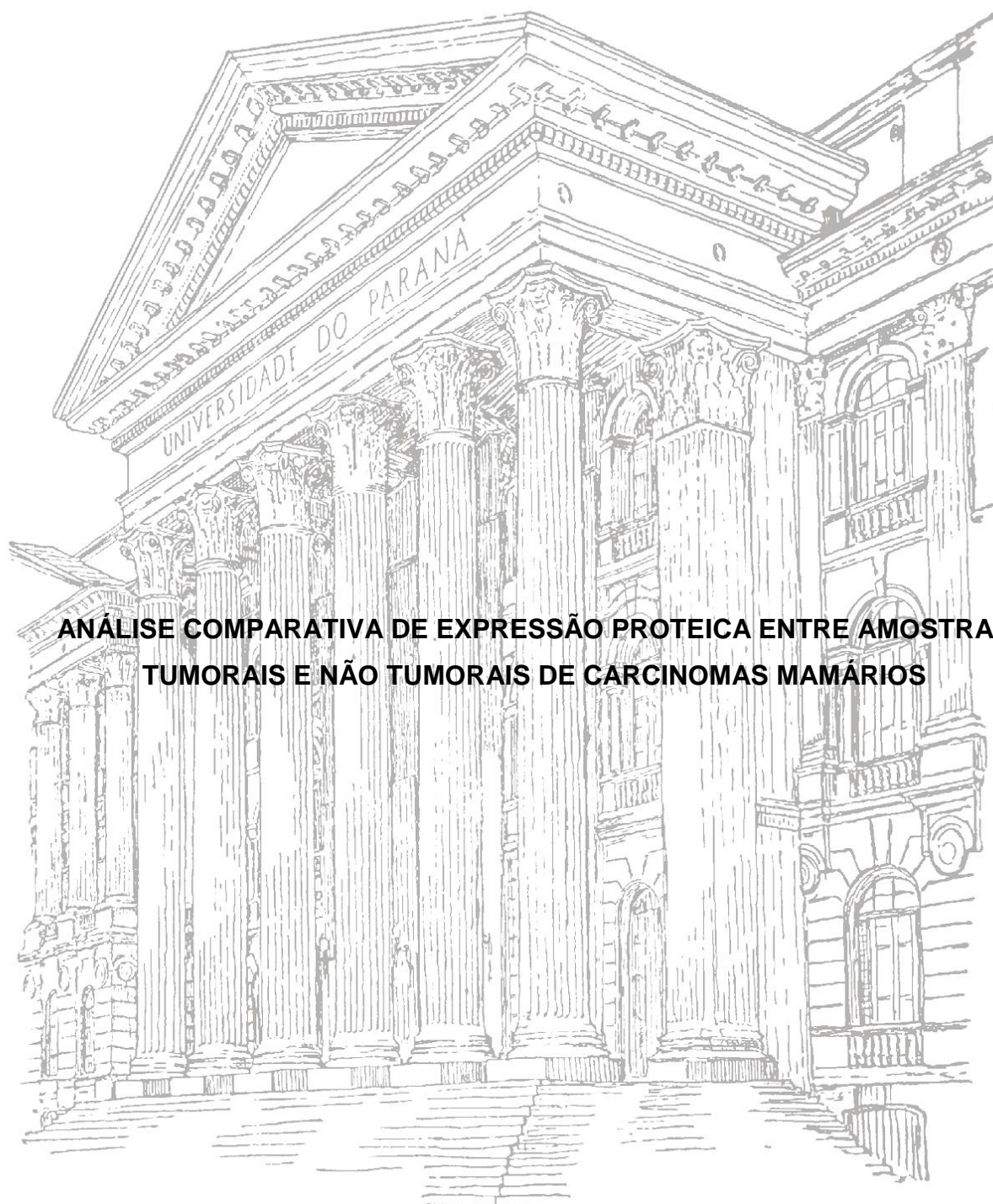


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GUSTAVO GÓES DA COSTA**



**ANÁLISE COMPARATIVA DE EXPRESSÃO PROTEICA ENTRE AMOSTRAS  
TUMORAIS E NÃO TUMORAIS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS**

**CURITIBA**

**2015**

GUSTAVO GÓES DA COSTA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE EXPRESSÃO PROTEICA ENTRE AMOSTRAS  
TUMORAIS E NÃO TUMORAIS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS**

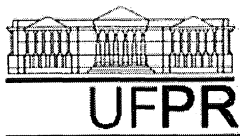
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2015



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **GUSTAVO GOES DA COSTA**, para obtenção do título de Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove o candidato. Secretária da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 26 de junho de 2015

**Doutor Roberto Rosati**  
Instituto Pelé Pequeno Príncipe – Membro Titular

**Doutor Juliano Javert Lourenço**  
Fundação Universidade Regional de Blumenau – Membro Titular

**Doutora Ana Claudia Bonatto**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

**Doutora Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

**Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**  
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

**Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

## AGRADECIMENTOS

À minha amada esposa Luana por simplesmente me amar e compreender os meus momentos de correria e estresse ao longo do curso.

Aos meus pais e irmãos por todo apoio e incentivo.

Aos meus orientadores (Dra. Enilze Ribeiro e Dr. Iglénir Cavalli) por acreditarem no meu potencial e participarem ativamente da minha formação e do desenvolvimento deste trabalho.

Ao membro da banca de acompanhamento (Dra. Maria Luiza Petzl-Erler) pelas sugestões e aos membros da banca de defesa (Dra. Ana Claudia Bonatto, Dr. Juliano Javert, Dr. Roberto Rosati e Dra. Valéria Roxo) por aceitarem avaliar e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética. Talita e Karla pela parceria e apoio na proteômica; Fabiano, Cíntia, Leandro, Tayana, Heloísa e Carol pelo apoio em RT-qPCR; Patrícia e Érika pelo apoio (que ainda não acabou) na imunohistoquímica; Bruna e Ana Luiza pelo apoio moral e alimentício com todos aqueles quitutes e balinhas; e a todos os membros em geral pelo ótimo ambiente de trabalho.

A todos os membros grupo de pesquisa dos professores Silvio Zanata, Lia Nakao e Adriana Mercadante por me aturarem e auxiliarem durante quase oito meses, em especial a Larissa, Zaine, Ingrid e Bruno pelo apoio no enlouquecedor *western blotting*; Clarissa e Valentin pelo apoio na imunohistoquímica; e em super especial ao Luiz Rizzo pelo apoio no WB, ELISA e pela parceria e amizade que já vem desde 2008.

Ao pessoal da proteômica do Departamento de Bioquímica, em especial Caroline e Gláucio.

À professora Roseli Wassen, Geisa e Joseph por serem sempre tão solícitos.

Aos meus amigos da caravana de Indaial, Florianópolis, Curitiba e demais que se espalharam pelo mundo.

Às pacientes que aceitaram participar deste estudo.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos produtos a base de cafeína e guaraná.

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres e cerca de 57.000 novos casos são esperados para a população brasileira em 2015. Um conhecimento sólido sobre a expressão proteica é essencial para a compreensão biológica, diagnóstico precoce e tratamento do câncer de mama. Os principais objetivos deste trabalho foram identificar proteínas diferencialmente expressas entre amostras pareadas de carcinoma ductal invasivo e tecido não tumoral de mama, e na seleção de possíveis alvos, avaliar e comparar a expressão de RNAm e proteica de STIP1 entre amostras de tecido de mama tumoral, não tumoral e de linfonodo metastático. A análise proteômica comparativa foi realizada pelo método de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida para cinco amostras pareadas, sendo consideradas apenas as bandas com diferença de expressão acima de duas vezes ( $p < 0,05$ ). As proteínas foram identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF). A expressão de RNAm foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real utilizando 53 amostras de tumor e oito de linfonodos metastáticos. Oito trios de amostras de tecido não tumoral, tumoral e linfonodo metastático tiveram a expressão de STIP1 comparada por *western blotting* (WB). A análise proteômica gerou 35 proteínas identificadas presentes em pelo menos duas amostras e, entre estas, as dez com maior variação de expressão foram: CASPE, ENOG, TPM1, CAPG, VIME, TPM3, TRFE, PDIA6, WDR61 e PDIA3. A expressão de RNAm de *STIP1* foi maior na amostra de tumor em relação ao tecido não tumoral e ao linfonodo, enquanto a análise por WB mostrou aumento significativo de expressão apenas entre tecido tumoral e não tumoral. Neste trabalho, identificamos mais de uma centena de proteínas diferencialmente expressas entre o tecido mamário não tumoral e tumoral, sendo muitas delas com participação já conhecida no câncer de mama enquanto outras ainda carecem de mais estudos. Entre elas encontra-se a proteína STIP1. A expressão de RNAm de *STIP1* se mostrou aumentada nas amostras de tumor e linfonodo em relação ao controle não tumoral. Também houve aumento em nos linfonodos em relação aos tumores, mas não houve diferença significativa em relação a quaisquer outros parâmetros avaliados. STIP1 apresentou um aumento de expressão significativo no tecido tumoral em relação ao tecido não tumoral, mas não houve diferença na expressão de amostras de tumor e linfonodo metastático em análise por WB. Esses dados preliminares sugerem o aumento de expressão de STIP1 já no início da tumorigênese, permanecendo no processo metastático. Em conclusão, descrevemos várias proteínas diferencialmente expressas, discutindo a função de algumas pré-selecionadas no câncer de mama e avaliando a potencial utilização das mesmas como marcadores de diagnóstico e prognóstico. Este conhecimento é útil não só na carcinogênese mamária, mas na compreensão dos mecanismos básicos dos cânceres em geral.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide, and about 57,000 new cases are expected for the Brazilian population in 2015. A solid knowledge of protein expression is essential for biological understanding, early diagnosis and therapeutics of breast cancer. The main objectives of this study were the comparisons between the proteome of paired samples of invasive ductal breast tumors and non-tumor tissues, selecting possible targets to evaluate and compare the mRNA and protein expression of STIP1 among samples from tumor, non-tumor and metastatic lymph node. The comparative proteomic analysis was performed by two-dimensional electrophoresis in polyacrilamide gel using five paired samples and considering for analysis just the spots with an expression difference over two fold ( $p < 0.05$ ). The proteins were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF). Quantitative real time PCR was used to evaluate mRNA using 53 tumor samples and eight metastatic lymph nodes. *ACTB* and *GAPDH* were used as housekeeping controls and a pool of non-tumor samples as a calibrator. Eight triplets' tumor, non-tumor and lymph node tissues had the expression of STIP1 compared by Western Blotting (WB). The proteomic analysis identified 35 proteins common to at least two samples and, among them, the ten with the highest differences in expression were CASPE, ENOG, TPM1, CAPG, VIME, TPM3, TRFE, PDIA6, WDR61 and PDIA3. The *STIP1* mRNA expression was higher in tumor samples than in non-tumor and lymph nodes. WB analysis showed a significant increase just between tumor and non-tumor samples. In the present work, we identified more than a hundred proteins with differential expression comparing tumor and non-tumor tissue, most of them with a recognized role in breast cancer and others needing more studies, like STIP1. The mRNA levels of *STIP1* were different between tumor and normal control and between tumor and lymph node, but no difference was seen with all other parameters analyzed. STIP1 was significantly overexpressed in tumor tissue compared with non-tumor but no difference was seen between tumor and metastatic lymph node in WB analysis. These preliminary data suggest the increase of STIP1 expression in early tumorigenesis, persisting during the metastatic process. In conclusion, we describe several differentially expressed proteins, discussing the function of pre-selected ones in breast cancer and evaluating their potential use as diagnosis or prognosis markers. This knowledge is useful not only to mammary carcinogenesis but also to the understanding of basic mechanisms of cancer in general.

## LISTA DE SIGLAS

2DE - Eletroforese bidimensional

2D-PAGE - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

APS - Persulfato de amônio

BSA - Albumina de soro bovino

CDI - Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS - Carcinoma Ductal *In Situ*

cDNA - DNA complementar

CGH - Hibridização genômica comparativa

CLI - Carcinoma lobular Invasivo

CLIS - Carcinoma lobular *In Situ*

DTT - Ditioneítrito

EGF - Fator de crescimento epidérmico

ER - Receptor de estrogênio

FGF - Fator de crescimento de fibroblasto

GF - Fator de crescimento

GO - *Gene Ontology*

HCCA - Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico

HNSG - Hospital Nossa Senhora das Graças

HOP - Hsp70/Hsp90-*Organizing Protein*

HRP - *Horseradish* peroxidase

HSP - Proteína *heat shock*

IEF - Focalização isoeleétrica

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IPG - Gel com pH imobilizado

LOH - Perda de heterozigose



MALDI-TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*

MM - Massas moleculares

MS - Espectrometria de massas

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

Paf1C - Complexo fator associado à polimerase II – 1

PCR - *Polymerase chain reaction*

pI - Ponto isoeletrico

PMF- *Peptide mass fingerprint*

ppm - Partes por milhão

PR – Receptor de progesterona

PTM - Modificações pós traducionais

RNA<sub>m</sub> - RNA mensageiro

RT-QPCR - PCR quantitativa em tempo real

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

siRNA - *Small interference RNA*

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

TEMED - N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina

TFA - Ácido trifluoroacético

TGF- $\alpha$  - Fator de crescimento transformador- $\alpha$

TNF - Fatores de necrose tumoral

TPR - *Tetratricopeptide repeat*

TRIC - Complexo TCP1 ring

WB - *Western blotting*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DA GLÂNDULA MAMÁRIA FEMININA E SEUS COMPONENTES. ....	14
FIGURA 2: JANELA DE OPORTUNIDADES PARA APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES NO DECORRER DA PROGRESSÃO TUMORAL.....	24
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR 2D-PAGE. ....	26
FIGURA 4: ESQUEMA SIMPLIFICADO DO FUNCIONAMENTO DO MALDI-TOF MS.....	27
FIGURA 5: ESTRUTURA DE <i>STIP1</i> EM HUMANOS E ORGANISMOS MODELOS.....	39
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GÉIS REFERÊNCIA E PAREAMENTO PARA ANÁLISE. ....	50
FIGURA 7: GÉIS DE REFERÊNCIA DE TECIDO NÃO TUMORAL E TECIDO TUMORAL DE CADA PACIENTE.....	58
FIGURA 8: GÉIS DE REFERÊNCIA DA AMOSTRA CP 645. ....	60
FIGURA 9: DESTAQUE DA BANDA 32 NO GEL DA AMOSTRA CP 645.....	67
FIGURA 10: DISTRIBUIÇÃO EM CLASSES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS. ....	68
FIGURA 11: GRÁFICOS DE DISPERSÃO DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO DE <i>STIP1</i> PARA OS PARÂMETROS AVALIADOS.. ....	71
FIGURA 12: LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA <i>STIP1</i> NO GEL DA AMOSTRA CP 633.. ....	72
FIGURA 13: WESTERN BLOTTING DA PROTEÍNA ALVO <i>STIP1</i> E DA PROTEÍNA NORMALIZADORA VINCULINA.....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: BIOMARCADORES PARA CÂNCER DE MAMA EM USO CLÍNICO. ....	28
TABELA 2: BIOMARCADORES DE CÂNCER (EXCETO DE MAMA) APROVADOS PELA FDA E SUAS APLICAÇÕES CLÍNICAS. ....	29
TABELA 3: PROVÁVEIS BIOMARCADORES PARA CÂNCER DE MAMA REPORTADOS EM 2012-2013 UTILIZANDO MS COMO PRINCIPAL PLATAFORMA DE DESCOBERTA. ....	29
TABELA 4: COMPILAÇÃO DE ALGUNS TRABALHOS QUE UTILIZARAM METODOLOGIAS DE PROTEÔMICA PARA ESTUDOS EM CÂNCER DE MAMA. ....	30
TABELA 5: FUNÇÕES DE STIP1 NO CÂNCER. ....	40
TABELA 6: CARACTERIZAÇÃO DAS 61 AMOSTRAS UTILIZADAS NO ESTUDO. ....	44
TABELA 7: PROGRAMA UTILIZADO NA ISOELETROFOCALIZAÇÃO DAS TIRAS PH 4-7. ....	47
TABELA 8: TOTAL DE BANDAS COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL ACIMA DE 2 VEZES (P<0,05) PARA CADA AMOSTRA PAREADA. ....	59
TABELA 9: PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS IDENTIFICADAS A PARTIR DA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL E NÃO TUMORAL. ....	61
TABELA 10: DEZ PROTEÍNAS COM MAIOR VARIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE ACORDO COM O TECIDO TUMORAL, PRESENTES EM AO MENOS DUAS AMOSTRAS. ....	65
TABELA 11: COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELA ANÁLISE PROTEÔMICA DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL E TRABALHOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA PARA AS PROTEÍNAS COMUNS A NO MÍNIMO DUAS AMOSTRAS. ....	65
TABELA 12: MÉDIA DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (QR) DE STIP1 EM TUMOR E LINFONODO METASTÁTICO, DE ACORDO COM OS PARÂMETROS ANALISADOS. ....	69
TABELA 13: VALORES DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (QR) OBTIDOS DE OITO AMOSTRAS PAREADAS DE TUMOR E LINFONODO METASTÁTICO. ....	70

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1. Caracterização do tecido mamário feminino .....	13
2.2. Câncer .....	16
2.3. Câncer de mama.....	18
2.3.1. Fatores de risco .....	19
2.3.2. Classificação molecular .....	21
2.4. Proteômica no estudo do câncer de mama.....	22
2.4.1. Análise de expressão gênica .....	36
2.5. STIP1 (fosfoproteína induzida por estresse-1) .....	37
3. JUSTIFICATIVA .....	41
4. OBJETIVOS .....	42
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
5.1. Caracterização da amostra .....	43
5.2. Coleta e processamento das amostras.....	43
5.3. Análise proteômica.....	46
5.3.1. Extração proteica .....	46
5.3.2. Dosagem de proteínas.....	46
5.3.3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) .....	47
5.3.4. Espectrometria de massas .....	50
5.4. Análise de expressão gênica .....	53
5.4.1. Extração do RNA total e retrotranscrição.....	53
5.4.2. Análise de RT-qPCR para <i>STIP1</i> .....	53
5.5. Análise da expressão de STIP1 .....	54
5.5.1 SDS-PAGE .....	54

5.5.2. <i>Western-Blotting</i> .....	54
5.5.3. Digitalização e densitometria .....	55
5.6. Análise estatística .....	56
6. RESULTADOS .....	57
6.1. Análise proteômica comparativa .....	57
6.2. Análise de expressão do gene <i>STIP1</i> por RT-qPCR .....	69
6.3. Análise de expressão de <i>STIP1</i> por <i>Western Blotting</i> .....	72
7. DISCUSSÃO .....	74
7.1. Análise proteômica comparativa .....	74
7.1.1. Classes funcionais .....	83
7.2. Análise da expressão <i>STIP1</i> por RT-qPCR e WB.....	85
7.3. Perspectivas.....	87
8. CONCLUSÕES .....	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE 1: Classificação funcional das proteínas identificadas .....	120
APÊNDICE 2: Dados de identificação proteica .....	126
APÊNDICE 3: Artigo.....	132

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar de vários grupos ao redor do mundo desenvolverem pesquisas sobre o câncer, este grupo de doenças continua sendo uma das principais causas de morte no mundo. Considerado inicialmente como uma doença principalmente de idosos, o câncer apresenta-se como um conjunto de doenças complexas que acomete indivíduos de idades diversas, inclusive crianças.

O tipo de câncer de maior incidência entre as mulheres é o de mama. Sua ocorrência em homens é muito menos frequente. Algumas das razões para isto é que a mama feminina apresenta uma estrutura mais complexa e sofre bruscas e constantes influências hormonais da puberdade até a menopausa.

Há diversas frentes de pesquisa que visam a compreensão do desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Entre os métodos utilizados, destacam-se as análises comparativas. Diferenças entre os tecidos tumoral e não tumoral são estudadas em relação à transcrição, tradução e modificações pós traducionais (PTM).

Neste trabalho, através da abordagem proteômica, proteínas diferencialmente expressas no tecido mamário tumoral e não tumoral estão sendo identificadas e confrontadas com estudos prévios disponíveis na literatura com o objetivo amplo de apontar proteínas que possam ser estudadas com mais profundidade e utilizadas na rotina como biomarcadores. Dentre todas as proteínas identificadas, a proteína STIP1 foi selecionada para análise de expressão gênica no nível de RNA mensageiro (RNAm) por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real e no nível tecidual através de *western blotting*. Com os resultados obtidos, esperamos contribuir para uma melhor compreensão do processo de carcinogênese mamária desde seus estágios iniciais (através da comparação tecido tumoral com não tumoral) até sua progressão para os estágios iniciais da metástase (através da avaliação de STIP1 também em linfonodos metastáticos).

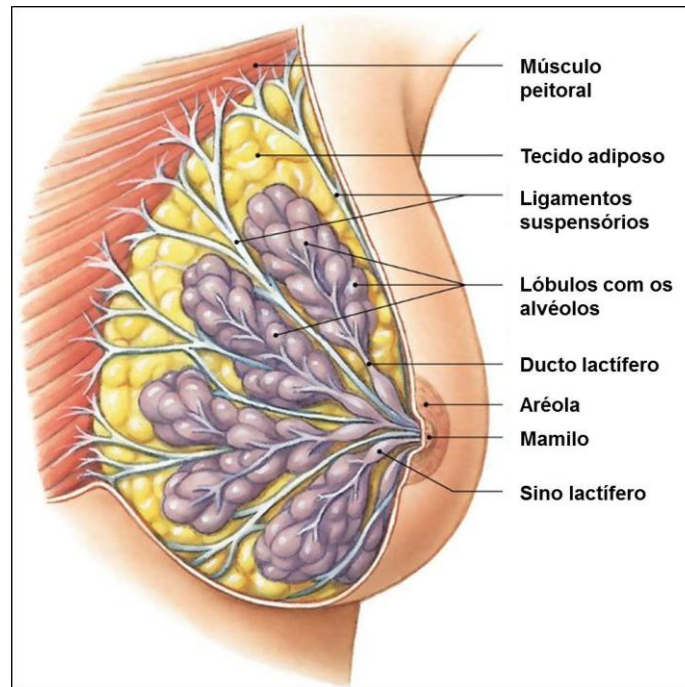
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Caracterização do tecido mamário feminino

O tecido mamário feminino é uma estrutura complexa que apresenta heterogeneidade celular e que é controlada pela ação hormonal e por vários fatores locais (COURTILLOT, 2005).

A glândula mamária humana (FIGURA 1) é composta por um epitélio ducto-lobular ramificado, delimitado por uma camada interna de células epiteliais luminais e uma camada externa de células mioepiteliais separadas do estroma intersticial por uma membrana basal íntegra (TOILLON *et al.*, 2007). Este epitélio secretor é circundado por estroma de tecido conectivo e adiposo e uma rede de capilares (NANDI, 1995). As células luminais são glandulares e polarizadas e formam a camada interior dos ductos e alvéolos, sendo responsáveis pela síntese e passagem do leite (NANDI, 1995). As células mioepiteliais contribuem para a formação da membrana basal e, devido a sua função contrátil, são responsáveis por expelir o leite (TOILLON *et al.*, 2007).

Apesar de ter sido importante para a compreensão de processos patológicos do tecido mamário nas últimas décadas, há evidências de que este modelo de estrutura da mama (composto apenas por células epiteliais luminais e mioepiteliais) é muito simplista. Em 2004, Bánkfalvi e colaboradores identificaram um terceiro tipo celular na mama através de estudos de ultraestrutura, imunohistoquímica e expressão gênica. Observaram que este tipo celular localiza-se tanto nas camadas basais quanto nas luminais. Com base nessas informações propôs-se a existência de células tronco epiteliais mamárias, responsáveis pela formação de novas estruturas durante o desenvolvimento da mama e conferindo a esta uma estrutura celular mais complexa (CLARKE e FULLER, 2006). Evidências indicam que essas células têm capacidade de originar células luminais e mioepiteliais, conferindo à mama um sistema integrado de renovação celular do seu epitélio (DONTU *et al.*, 2003; ALLRED *et al.*, 2004).



**FIGURA 1: Esquema da glândula mamária feminina e seus componentes.**

FONTE: Adaptado de ©Pearson Education, Inc. (2013).

O estroma intersticial corresponde a mais de 80% do volume da mama humana. Os principais tipos de estroma na mama são: tecido adiposo; tecido conectivo intersticial/interlobular denso; tecido conectivo intralobular frouxo; e vasos sanguíneos. A proporção de tecido adiposo em relação ao estroma intersticial fibroso, assim como a quantidade total de estroma, apresenta amplas variações entre indivíduos (RONNOV-JESSEN *et al.*, 1996).

A proliferação, diferenciação e funcionalidade da mama são reguladas por uma ação combinada entre hormônios esteroides, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (secretados pelas células luminiais, mioepiteliais e pela porção estromal) através de interação célula-célula (NANDI, 1995; PAGE, *et al.*, 1999).

Três classes de hormônios esteróides são produzidas nos ovários: estrógenos, progesterona e andrógenos. Embora o mecanismo pelo qual estes hormônios estimulam a proliferação do epitélio mamário não esteja bem estabelecido, estudos sugerem que a regulação da proliferação celular ocorra por três mecanismos principais: mediado por receptor; *loop* autócrino/parácrino; e *feedback* negativo (MUTI, 2005; NAVARRETE *et al.*, 2005). Famílias de fatores de



crescimento (GF) como a do GF epidermico/ GF transformador-a (EGF/TGF- $\alpha$ ), a do GF semelhante à insulina (IGF) e a do GF de fibroblastos (FGF) já foram descritas como importantes para a regulação do desenvolvimento mamário (NANDI *et al.*, 1995).

O uso de contraceptivos orais, a gravidez, a fase do ciclo celular e mesmo a idade são fatores que acarretam em uma resposta das células epiteliais devido às flutuações hormonais. Essas respostas podem ser de desregulação da proliferação, diferenciação ou apoptose. Contudo, esta resposta é localizada, englobando uma pequena fração de células, sugerindo a existência de regulação local (NAVARRETE *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da glândula mamária relaciona-se com o desenvolvimento sexual e reprodutivo e é classificado em estágios bem definidos: embrionário, pré-puberdade, puberdade, gestação, lactação e involução (HENNIGHAUSEN e ROBINSON, 2001).

Na puberdade, o aumento nos níveis de estrogênio e progesterona resulta no rápido crescimento das glândulas mamárias que sofrem uma expansão substancial da população celular do epitélio durante este período (KIM *et al.*, 2008). Kim e colaboradores (2008) evidenciaram a expressão proteica diferencial entre ratas no estágio pré-puberdade e pós-puberdade. A faixa dos 15 aos 25 anos é caracterizada pela adição de estruturas lobulares ao sistema de ductos já existente. A proliferação de ácinos e lóbulos ocorre até os 35 anos aproximadamente, sendo que a produção de estrogênios pelos ovários estimula esta fase.

Todas as mudanças cíclicas que ocorrem entre os 15 e 60 anos de idade envolvem proliferação e involução das estruturas mamárias devido ao ciclo menstrual e gestação, e possibilitam o surgimento de pequenas disfunções (HUGHES, 2000; COURTILLOT, 2005). Durante o intervalo entre os 35 e 55 anos de idade ocorre uma involução concomitante que afeta os lóbulos e é fortemente dependente da relação entre o epitélio e o estroma especializado do lóbulo (HUGHES, 2000).

O processo de involução lobular caracteriza-se pela substituição de tecidos conectivos intralobulares (responsivos a hormônios) por tecido intralobular fibroso. Ao final da menopausa restam poucos ductos e alguns (ou nenhum) lóbulos

(COURTILLOT, 2005), ocorre a atrofia glandular e o tecido parenquimatoso é substituído por tecido adiposo (INCA, 2000). O risco de que ocorram disfunções no tecido mamário é aumentado pela involução. Contudo, a taxa e a extensão deste processo são bastante variáveis e já foi documentado em mulheres com menos de 40 anos de idade, indicando que os fatores envolvidos não são limitados ao início da menopausa (MILANESE *et al.*, 2006).

Diversos são os fatores que influenciam as estruturas anatômicas da mama, entre eles a multiparidade, idade, estado pré-menstrual e terapia de reposição hormonal (BUDEL, 2007). A compreensão dos mecanismos e fatores de regulação que atuam no tecido mamário é de grande importância, pois podem predispor este tecido ao desenvolvimento de doenças como, por exemplo, o câncer (NAVARRETE *et al.*, 2005).

## **2.2. Câncer**

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é, em todo o mundo, uma das principais preocupações na área de saúde pública. No ano de 2012, houve 14,2 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em decorrência do câncer. Devido a fatores como a redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas e o crescimento e envelhecimento da população, estima-se que em 2030 haverá cerca de 21,4 milhões de novos casos de câncer no mundo, causando 13,2 milhões de mortes (OMS, 2012).

Apesar de, atualmente, ser responsável por grande número de mortes no mundo, o câncer não é uma doença da vida moderna. Descrições foram encontradas em papiros que datam de 1.600 a.C. no Egito (AAPC, 2011). O câncer é uma doença multifatorial resultante do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Estas alterações ocorrem principalmente em genes envolvidos no controle do ciclo celular, desencadeando uma proliferação celular desordenada (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2009). A palavra câncer designa as formas mais agressivas de neoplasia, com capacidade de estabelecer metástases, havendo mais de 100 tipos desta doença (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

O envelhecimento é um fator importante na tumorigênese, visto que a maioria dos casos é detectada em pacientes com mais de 65 anos de idade (INCA, 2014). Com o avanço da medicina e melhorias na qualidade de vida houve aumento considerável da expectativa de vida populacional (a população brasileira possui expectativa de 70 e 77 anos para homens e mulheres, respectivamente, dez a menos que a japonesa, que possui a maior expectativa de vida) e, desta forma, o câncer obteve uma maior atenção nas últimas décadas (OMS, 2012).

Tumores benignos formam uma massa de células neoplásicas que permanecem agregadas. O tumor é denominado câncer apenas quando maligno (ALBERTS *et al.*, 2004). Neste último caso, além da autonomia proliferativa, as células apresentam também perda da coesão. Isto permite a mobilidade celular tornando-as invasivas (MAREEL e LEROY, 2003). Sarcomas, carcinomas e malignidades hematopoiéticas e linfoides são as três formas principais de câncer. Os primeiros surgem em tecidos mesenquimais. Carcinomas se originam de tecidos epiteliais, como ductos mamários por exemplo. Malignidades hematopoiéticas e linfoides se originam na medula óssea e no sistema linfático respectivamente (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Dentre as anormalidades genéticas observadas no câncer destacam-se a expressão aumentada de proto-oncogenes, a inativação de genes supressores de tumor, instabilidades cromossômicas, alterações nos genes de reparo de DNA, alterações epigenéticas (GARNIS *et al.*, 2004), e disfunção da telomerase (GILLEY *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos indicam que os fatores ambientais são responsáveis pela maioria dos casos de câncer, sendo que lesões no DNA estão consistentemente associadas ao risco de desenvolvimento de neoplasias (SMITH *et al.*, 2003; CRESPI e SUMMERS, 2005; CEBRIANT *et al.*, 2006). Portanto, as alterações pelas quais uma célula torna-se tumoral são o resultado de interações entre os fatores genéticos e carcinógenos (físicos, químicos ou biológicos) (OMS, 2012).

### 2.3. Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, sendo responsável por 16% de todos os tipos de câncer neste sexo (OMS, 2011). De acordo com os últimos dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014) foi estimado, tanto para 2014 como 2015, 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100.000 mulheres. Apesar dos esforços para o controle da doença, a incidência continua aumentando na maioria dos países e as estimativas apontam para um crescimento ainda maior nos próximos 20 anos (HOWELL *et al.*, 2014).

Mesmo considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente, a mortalidade no Brasil é alta. Isto é atribuído ao fato de que a maioria dos casos é identificada em estágios avançados. A taxa de sobrevivência em países desenvolvidos é de 85%. No Brasil esse valor é de 80% e em outros países em desenvolvimento varia entre 50% a 60% (INCA, 2014), enquanto países de baixa renda apresentam taxa de sobrevivência de 40% (COLEMAN *et al.*, 2008). Acredita-se que um terço das mortes por câncer de mama poderia ser evitado se a doença fosse detectada em estágio inicial (INCA, 2014).

Assim como a palavra câncer se refere a diversas doenças, o termo “câncer de mama” também não se restringe a um único tipo tumoral. Há uma classificação baseada em sua origem e características histológicas, onde se destacam os carcinomas *in situ* e os carcinomas invasivos. Os carcinomas *in situ* caracterizam-se pela proliferação de células epiteliais malignas que permanecem confinadas aos ductos (carcinoma ductal *in situ* - CDIS) ou lóbulos mamários (carcinoma lobular *in situ* - CLIS). Nestes casos não há evidência de invasão da membrana basal e esta peculiaridade diferencia os carcinomas *in situ* dos invasivos. Neste último tipo a membrana basal é parcial ou totalmente destruída, havendo invasão dos tecidos adjacentes. O carcinoma ductal invasivo (CDI) (65-80%) e o carcinoma lobular invasivo (CLI) (5-15%) constituem os tipos mais representativos (HONDERMARCK, 2003).

O sistema de classificação de tumores (TNM) trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica da doença, determinada clínica e

histopatologicamente quando possível. Este sistema tem por base a avaliação de três componentes: T - extensão do tumor primário, N - ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e M - ausência ou presença de metástases à distância (TNM: CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS, 2004).

De acordo com aspectos da formação do túbulo/glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas, os carcinomas mamários são histologicamente divididos e pontuados numa escala de 1 a 3 e então classificados em categorias: grau I – bem diferenciado (bom prognóstico); grau II – moderadamente diferenciado; e grau III – indiferenciado (mau prognóstico). Tanto o sistema TNM quanto o grau histológico são significativamente associados com a sobrevida no câncer de mama invasivo e são reconhecidos como fatores prognósticos importantes (BATEMAN, 2007; OLDENBURG *et al.*, 2007).

### 2.3.1. Fatores de risco

Admite-se que o câncer de mama é o resultado da interação de fatores genéticos com o estilo de vida, hábitos reprodutivos e o meio ambiente (JOHNSON-THOMPSON & GUTHRIE, 2000). Acredita-se que 90-95% dos cânceres sejam esporádicos (não-familiares) ou decorram de mutações somáticas que se acumulam durante a vida (BALMAIN *et al.*, 2003), e que 5-10% sejam hereditários, causados por mutações germinativas raras em genes de alta penetrância como o *BRCA1* e o *BRCA2* (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Cerca de 30% de mulheres jovens que desenvolvem câncer de mama devem apresentar um padrão genético de predisposição à doença (DUFLOTH *et al.*, 2005).

Vários fatores de risco para o câncer de mama estão bem estabelecidos, sendo o histórico familiar um dos principais (IARC, 2008; LACEY *et al.*, 2009). Além de mutações germinativas mais conhecidas como em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, vários outros genes já são diretamente implicados no alto risco de desenvolver a doença, com maior ou menor penetrância, tais como *PTEN*, *CHEK2*, *STK11*, *MMR*, entre outros (ECONOMOPOULOS *et al.*, 2015).

Entre os fatores de risco mais importantes estão os fatores reprodutivos associados à exposição prolongada a estrogênios endógenos como menarca

precoce, menopausa tardia e idade avançada na primeira gestação. Hormônios exógenos também elevam o risco da doença. Usuários de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal têm um risco maior do que não usuários. A amamentação demonstrou exercer um efeito protetor (COLLINS *et al.*, 2005; IARC, 2008; LACEY *et al.*, 2009).

Certas características físicas como a obesidade e alta densidade da mama também estão relacionadas com aumento do risco. A cada 5 kg de ganho de peso este risco aumenta cerca de 8%, enquanto mulheres com mais de 75% de aumento na densidade da mama têm cinco vezes mais chances de desenvolver tumor do que mulheres com menos de 5% de aumento de densidade. O sedentarismo também contribuiu para o desenvolvimento do câncer de mama (OLDENBURG *et al.*, 2007).

O consumo regular de álcool, mesmo que moderadamente, é identificado como fator de risco (MORCH *et al.*, 2005) assim como uma dieta rica em gordura. Estudos epidemiológicos sugerem que dietas ricas em fitoestrógenos (isoflavonas e lignanos, por exemplo) podem estar associadas com um menor risco (OLDENBURG *et al.*, 2007). Mulheres regularmente expostas ao cigarro, mesmo fumantes passivas, apresentaram um aumento no risco de desenvolver câncer de mama, em oposição àquelas que nunca se expõem ao tabaco, num risco particularmente associado ao período pré-menopausa (JOHNSON, 2005).

Além destes, como é característica de qualquer tipo de câncer, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. Apesar de raro antes de 35 anos de idade, acima desta faixa etária há um aumento progressivo e rápido na incidência do câncer de mama (INCA, 2014).

Mesmo com os vários dados apresentados, devido à heterogeneidade populacional (tanto genética como de hábitos de vida) não é possível identificar fatores de risco específicos para a maioria das mulheres com câncer de mama (IARC, 2008; LACEY *et al.*, 2009).

### 2.3.2. Classificação molecular

A utilização de microarranjos para análise de cDNA propiciou a identificação de subtipos moleculares de carcinomas mamários que apresentam um perfil distinto de expressão gênica. Proveniente de estudo em mais de 8.000 genes oriundos de amostras de 42 pacientes, o perfil de expressão gênica de carcinomas de mama foi descrito inicialmente por Perou e colaboradores (2000) e complementado pelo mesmo grupo (SORLIE *et al.*, 2001). Estes estudos iniciais demonstraram que os perfis de expressão gênica mantêm uma variação sistemática que permite a classificação em cinco grupos distintos: luminal A e luminal B (assim designados devido ao padrão de expressão similar ao das células epiteliais luminais), superexpressão do HER2/ERBB2, *normal breast-like* e *basal-like*.

O subtipo luminal A é o mais comum dos carcinomas mamários, entre 50 - 60% (ARVOLD *et al.*, 2011; CAREY *et al.*, 2006). Tem maior expressão de receptores de estrogênio (ER) e genes regulados pelo estrogênio (LOI, 2008) e apresenta elevada expressão de genes como das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 (VIEIRA *et al.*, 2008). Este subtipo apresenta o melhor prognóstico, com cerca de 90% dos pacientes tendo taxa de sobrevivência de 5 anos, menos casos com comprometimento de linfonodos (O'BRIEN *et al.*, 2010) e menor taxa de recorrência local (ARVOLD *et al.*, 2011) e à distância (KENNECKE *et al.*, 2010).

O subtipo luminal B abrange de 10% a 30% dos casos de câncer de mama (ARVOLD *et al.*, 2011; CAREY *et al.*, 2006). Quando comparado ao luminal A em relação à expressão gênica, o luminal B apresenta expressão mais baixa de ER e genes relacionados e alta expressão de genes relacionados à proliferação e ciclo celular (SORLIE *et al.*, 2001). Apesar do prognóstico deste subtipo ser um pouco pior do que o do luminal A, ainda é melhor do que o dos demais subtipos (ARVOLD *et al.*, 2011; O'BRIEN *et al.*, 2010; KENNECKE *et al.*, 2010). Ainda não há distinção proteômica entre os subtipos luminal A e B.

Com uma prevalência entre 10 - 15% entre os tumores de mama, a amplificação do gene *HER2* acompanhada da superexpressão da proteína HER2 é tida como importante marcador de prognóstico. Tumores classificados neste subtipo respondem bem a drogas como o *Trastuzumab*, que bloqueia a atividade deste

receptor e acarreta na melhora da sobrevida. Apesar disso, este subtipo está associado a um prognóstico ruim (VIEIRA *et al.*, 2008).

Perou e colaboradores (2000) mostraram que os tumores *basal-like* compartilham algumas características moleculares com as células mioepiteliais. São caracterizados pela coloração positiva para estas células, pela presença de citoqueratinas 5, 6 e 17 e por serem negativos para os receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e HER2 (LOI, 2008). Portanto, não respondem ao tratamento com drogas antiestrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2, sendo associados a um pior prognóstico. Este subtipo corresponde a 10 - 20% dos tumores mamários (ARVOLD *et al.*, 2011; CAREY *et al.*, 2006).

O subtipo *normal breast-like* caracteriza-se pela expressão elevada de genes expressos no tecido adiposo e em outros tipos celulares não epiteliais. Tumores deste subtipo apresentaram expressão acentuada de genes do epitélio basal e diminuída do epitélio luminal. A distinção, bem como o valor clínico, deste subtipo ainda não está clara (VIEIRA *et al.*, 2008), podendo ser inclusive um artefato técnico devido ao baixo número de células de tumor (BADVE *et al.*, 2011).

A classificação do câncer de mama baseada em padrões de expressão gênica busca a caracterização de subgrupos com significado clínico, apresentando correlação com sobrevida, recidiva, locais preferenciais para metástase e resposta à quimioterapia (LAM *et al.*, 2013). A classificação de carcinomas mamários por imunohistoquímica apresenta boa concordância com a classificação molecular de diferentes carcinomas mamários (CAREY *et al.*, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2010) e devido ao alto custo das técnicas de microarranjo, a imunohistoquímica acaba sendo um método importante para definir biomarcadores proteicos substitutos para a classificação do câncer de mama (SOTIRIOU & PICCART, 2007). Com isso, ambas as classificações são utilizadas na definição do subtipo tumoral.

#### **2.4. Proteômica no estudo do câncer de mama**

Os métodos mais usados para a detecção de tumores de mama, benignos ou malignos são técnicas de imagem: mamografia, ultrassonografia e ressonância

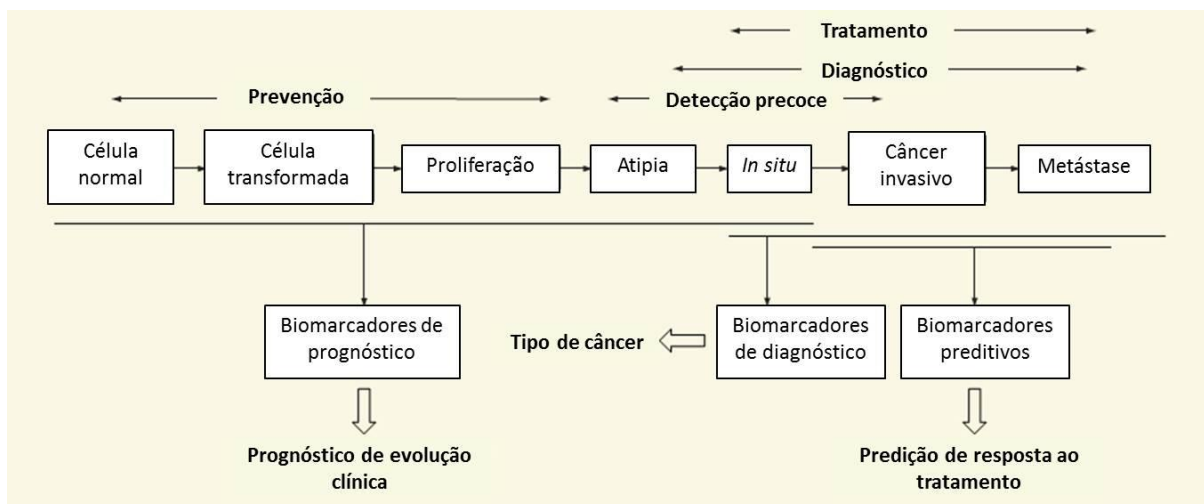


magnética. Infelizmente, mais de 20% dos novos casos da doença não são detectados por estes métodos, indicando a necessidade de identificação de novos marcadores moleculares, que proporcionem detecção e diagnóstico mais eficazes (PIETROWSKA *et al.*, 2009).

O *Biomarkers Definitions Working Group* elaborou a definição para biomarcador mais aceita atualmente, a qual o define como “uma característica que é objetivamente mensurada e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas às intervenções terapêuticas” (BDWG, 2001). Portanto, os biomarcadores podem ser utilizados para várias finalidades na pesquisa sobre o câncer. Podem ser mensurados em diferentes tipos de câncer e amostras, tais como amostras de tecido ou sangue periférico, através de técnicas diversas (MARCHIÒ *et al.*, 2011).

Biomarcadores para processos patogênicos (classificados como marcadores de efeito) podem ser agrupados em três classes principais: diagnóstico, pode auxiliar especialmente quando houve metástase, mas o tumor de origem não pode ser determinado; prognóstico, tal como os receptores hormonais e marcadores angiogênicos e de proliferação, podem fornecer informações sobre o curso clínico ou malignidade da doença; e preditivo, podem antever o curso da doença perante diferentes formas de tratamento (AZAD *et al.*, 2006). A Figura 2 mostra as janelas de oportunidade para aplicação destes biomarcadores.

Mutações gênicas, alterações na transcrição e tradução e alterações nos produtos proteicos podem potencialmente ser utilizadas como biomarcadores específicos de doenças (WULFKUHLE *et al.*, 2003). A maioria dos biomarcadores utilizados na clínica é de origem proteica ou baseada em anticorpo (*antibody-based*). Isto se deve principalmente por características como alta sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade e robustez em diversos tipos de amostra, seja parafinizada, congelada ou em fluidos corporais (OU *et al.*, 2008). São as proteínas que realizam funções celulares diversas e vitais, sendo que todos os comportamentos celulares em vida podem, em geral, ser interpretados no nível proteico. Gradualmente tornou-se aceitável que a análise direta das proteínas poderia ser mais produtiva para um melhor entendimento sobre o câncer (HONDERMARCK *et al.*, 2002).



**FIGURA 2: Janela de oportunidades para aplicação de biomarcadores no decorrer da progressão tumoral.**

FONTE: Adaptada de GROMOV *et al.*, 2014.

Esta necessidade por biomarcadores ocasionou um aumento significativo de estudos proteômicos em diversos tipos de câncer. Como os níveis de RNAm não correspondem necessariamente à abundância das proteínas, a proteômica tem potencial para complementar e ampliar a riqueza de informações geradas pela genômica e transcriptômica. Modificações pós-traducionais, as quais não são detectadas no RNAm, alteram a complexidade proteica e desempenham papéis importantes na estabilidade, localização, interações e funções de uma proteína (BERTUCCI *et al.*, 2006). Neste aspecto, a proteômica surge como um campo promissor que tem potencial para diversas aplicações, incluindo a identificação de biomarcadores e o monitoramento de doenças, especialmente na oncologia (AZAD *et al.*, 2006).

Algumas características tornam esta metodologia tecnicamente desafiadora, são elas: tumores primários são geralmente pequenos e apresentam diversas populações celulares distintas o que pode causar variabilidade significativa entre perfis proteicos; contribuições de alguns desses tipos celulares podem mascarar sinais intrínsecos do tumor; e o trabalho, tempo e custo necessários podem ser proibitivos para alguns centros quanto à obtenção de um número estatisticamente significativo de amostras de tumor primário (OU *et al.*, 2008).

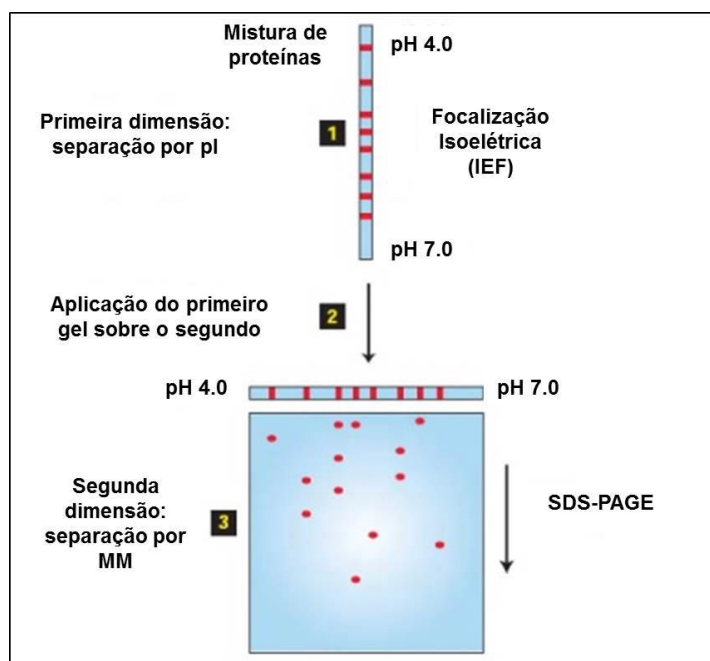
As estruturas celulares de tumores de mama e da glândula mamária sadia são dinâmicas e heterogêneas, portanto, a comparação entre seus proteomas é uma

análise de misturas celulares em diferentes proporções, compreendendo células epiteliais, mioepiteliais, endoteliais, adipócitos, macrófagos, fibroblastos e demais células circulantes (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

O termo Proteoma foi utilizado pela primeira vez pelo geneticista australiano Marc Wilkins em 1994, mas a primeira descrição de uma abordagem que atualmente seria dita como proteômica data da década de 80, com a utilização de eletroforese bidimensional (2DE) seguida pela identificação de proteínas através do método de degradação de Edman (BAUW *et al.*, 1989).

Na eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), as proteínas íntegras são separadas de acordo com duas propriedades físico-químicas independentes (FIGURA 3). A primeira dimensão é chamada de focalização isoelétrica (IEF) e as proteínas migram em uma tira contendo gel com pH imobilizado até atingirem o seu ponto isoelétrico (pI). A segunda dimensão ocorre pela eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), na qual as proteínas migram de acordo com suas massas moleculares (MM) específicas (GUO *et al.*, 2007). Ao final do procedimento, tem-se um gel com várias bandas dispersas onde cada uma corresponde a uma proteína ou a subunidade de proteínas multiméricas.

Com o passar do tempo, a 2DE e técnicas relacionadas começaram a ser questionadas por limitações atribuídas exclusivamente à proteômica baseada em géis como, por exemplo, resolução de proteínas hidrofóbicas e de pI extremo, e foram estabelecidos dogmas, sendo que não havia razões físico-químicas para vários deles.



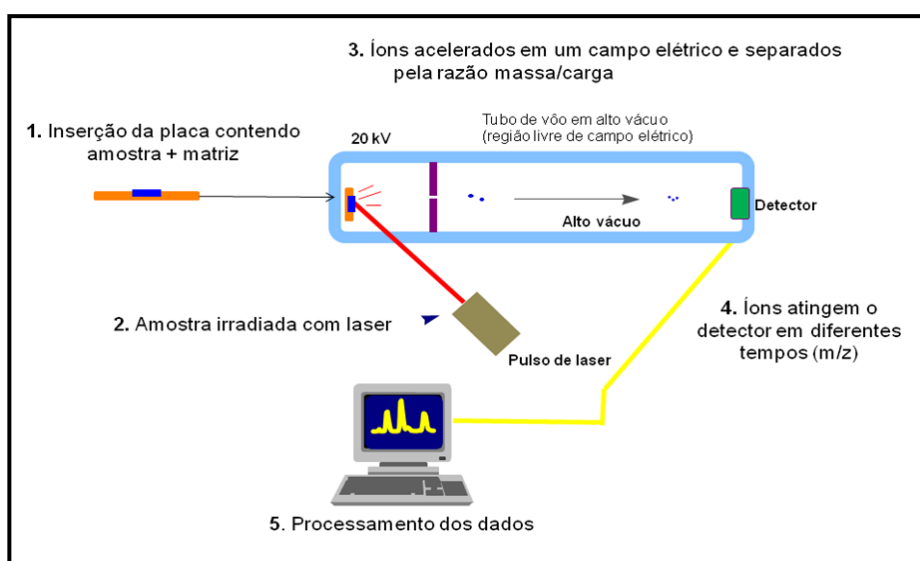
**FIGURA 3: Representação da separação de proteínas por 2D-PAGE.**

FONTE: Adaptado de <<http://biosiva.50webs.org/proiso.htm>>, 2015.

O surgimento de técnicas de proteômica *shotgun* (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), que se refere à análise direta de misturas proteicas complexas para gerar um perfil global do complemento proteico em um intervalo de tempo menor (WU & MacCOSS, 2002), veio com a expectativa de superar essas dificuldades da 2DE e logo foi considerada a nova era da análise proteômica. Contudo, o tempo também mostrou que limitações, antes atribuídas apenas à 2DE, persistiam no modelo *shotgun*, tal como a separação de proteínas em baixa concentração e proteínas hidrofóbicas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Apesar do desenvolvimento de técnicas alternativas, a 2DE continua sendo amplamente utilizada para análise proteica de expressão diferencial. O número de artigos publicados se mantém alto e confirma a 2DE como técnica central na proteômica. Seu alto poder de resolução permite a separação de proteínas de amostras complexas. Enquanto as abordagens *shotgun* fazem uma varredura ampla em busca de alterações no proteoma, as abordagens 2DE se baseiam em avaliações de alta resolução, incluindo isoformas e PTMs. Associada à espectrometria de massas (MS), a 2DE permanece como uma tecnologia bem desenvolvida e, dependendo do propósito do estudo, até mesmo sendo considerada uma metodologia *gold-standard* (ROGOWSKA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

As técnicas de MS por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*) (FIGURA 4) são frequentemente utilizadas para determinar marcadores e mecanismos relacionados ao desenvolvimento do câncer. O método de identificação proteica por *peptide mass fingerprinting* (PMF), obtido pelo MALDI-TOF, é o mais rápido e barato (RODRIGO *et al.*, 2014) e tem sido utilizado em diversas publicações recentes para determinação de biomarcadores em câncer de mama (BÖHM *et al.*, 2011; LÓPES-ÁRIAS *et al.*, 2012; QIN & LING, 2012).



**FIGURA 4: Esquema simplificado do funcionamento do MALDI-TOF MS.**

FONTE: COSTA, 2010.

Em 2006, Polanski e Anderson compilaram dados provenientes da literatura e de outras fontes e elaboraram uma lista com 1261 proteínas diferencialmente expressas em cânceres humanos, sendo 34 relacionadas ao câncer de mama. Entretanto, atualmente apenas sete proteínas são aprovadas ou recomendadas para aplicação clínica em câncer de mama (TABELA 1) e 13 em outros tipos de tumor (TABELA 2). A Tabela 3 apresenta potenciais biomarcadores para câncer de mama relatados recentemente em estudos translacionais com número amostral superior a 100.

**TABELA 1:** Biomarcadores para câncer de mama em uso clínico.

<b>Biomarcador</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Análise</b>	<b>Ano de aprovação</b>	<b>Fase de desenvolvimento</b>
uPA/PAI-1	Escolha de tratamento	IHC de tecido	2007	Recomendado pela ASCO
Células de tumor circulantes	Predição de progressão e sobrevida	Imuno-captura / fluorescência em sangue	2005	Aprovado pela FDA
ER Receptor	Prognóstico e resposta terapêutica	IHC de tecido	1999	Aprovado pela FDA/EMA/NICE
PR Receptor	Prognóstico e resposta terapêutica	IHC de tecido	1999	Aprovado pela FDA/EMA/NICE
Her-2 Receptor	Escolha de tratamento	IHC de tecido	1998	Aprovado pela FDA/EMA/NICE
CA 15-3	Monitoramento de resposta terapêutica	Imuno-ensaio em soro	1997	Aprovado pela FDA/EMA
CA 27.29	Monitoramento de resposta terapêutica	Imuno-ensaio em soro	1997	Aprovado pela FDA/EMA

NOTA: ASCO: *American Society of Clinical Oncology*; FDA: *Food and Drug Administration*; EMA: *European Medicines Agency*; NICE: *National Institute for Health and Clinical Excellence*.

FONTE: Adaptado de ZEIDAN *et al.*, 2015.

Para o câncer de mama, os receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) e o HER2 estão bem estabelecidos. Destes, sem dúvida o ER é o mais utilizado como biomarcador de prognóstico e preditivo. Pacientes ER positivos apresentam melhor prognóstico. Como marcador preditivo, ER foi o primeiro recomendado para uso na rotina em câncer de mama, selecionando pacientes responsivos ao tratamento endócrino (PAVLOU *et al.*, 2013). Os tumores de mama ER positivos (cerca de 80%) têm o estradiol como principal estimulante de crescimento, portanto o ER torna-se alvo direto de terapias endócrinas (WEIGEL e DOWSETT, 2010).

A classificação do câncer de mama em subtipos por perfil de expressão gênica e imunohistoquímica tem sido muito útil para o prognóstico e resposta ao tratamento. As análises proteômicas podem também apontar novas proteínas relacionadas à subtipos específicos de câncer de mama e refinar esta classificação, além de expor biomarcadores proteicos prontos para serem usados na classificação imunohistoquímica (LAW *et al.*, 2013).

A Tabela 4 apresenta uma visão ampla de estudos que visam à descoberta de biomarcadores para câncer de mama utilizando abordagens proteômica.

**TABELA 2:** Biomarcadores de câncer (exceto de mama) aprovados pela FDA e suas aplicações clínicas.

Biomarcador	Aplicação	Tipo de câncer	Fonte
$\alpha$ -fetoproteína (AFP)	Estadiamento	Testicular não seminomatoso	Soro
Gonadotrofina coriônica humana (hGC)	Estadiamento	Testicular	Soro
Antígeno carboidrato 19-9 (CA19-9)	Monitoramento	Pâncreas	Soro
Antígeno carboidrato 125 (CA-125)	Monitoramento	Ovário	Soro
Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Monitoramento	Colorretal	Tecido
Receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR)	Preditivo	Colorretal	Tecido
Homólogo do oncogene viral do sarcoma felino 4 v-kit Hardy-Zuckerman (KIT)	Preditivo	Gastrointestinal	Tecido
Tireoglobulina (TG)	Monitoramento	Tireóide	Soro
Antígeno específico da próstata (PSA)	Screening e Monitoramento	Próstata	Soro
Proteína de matriz nuclear 22 (NMP-22)	Screening e Monitoramento	Bexiga	Urina
Produtos da degradação de fibrina/fibrinogênio (FDP)	Monitoramento	Bexiga	Urina
Antígeno tumoral da bexiga (BTA)	Monitoramento	Bexiga	Urina
CEA de alto peso molecular e mucina	Monitoramento	Bexiga	Urina

FONTE: Adaptado de PAVLOU *et al.*, 2013.

**TABELA 3:** Prováveis biomarcadores para câncer de mama reportados em 2012-2013 utilizando MS como principal plataforma de descoberta.

Biomarcador	Aplicação	Análise	Grupo alvo	Ano de descoberta
Cluster de diferenciação 14 (CD14)	Predição de recidiva	MS / ELISA de soro	Pacientes Her-2 negativo	2013
Receptor de ácido retinóico alfa (RARA)	Desenho de tratamento	MS / Imuno-ensaio de tecido	Pacientes ER positivo	2013
Quiescina sulfidril oxidase 1 (QSOX1)	Prognóstico	MS / Imunohistoquímica	Tumores Luminal B	2013
Decorina (DCN)	Prognóstico e protocolo terapêutico	MS / Imunohistoquímica	Tumores primários	2012
Endoplasmina (ENPL)	Prognóstico e protocolo terapêutico	MS / Imunohistoquímica	Tumores primários	2012
Cadeia leve da ferritina (FLN)	Prognóstico e resposta terapêutica	MS / 2D-PAGE a partir de tecido	Pacientes linfonodo negativo	2012

NOTA: Estudos com número amostral >100.

FONTE: Adaptado de ZEIDAN *et al.*, 2015.

**TABELA 4:** Compilação de alguns trabalhos que utilizaram metodologias de proteômica para estudos em câncer de mama.

Abordagem Proteômica	Tipo de Amostra	Propósito do estudo	Proteínas Candidatas	Validação / Verificação	Referência
2D-DIGE / MALDI-TOF MS	Tecido	Tumor RH+ vs. Tecido não tumoral	PPIB, GDIR1 e TPM4	Ver: WB	WEITZEL <i>et al.</i> , 2010.
1D-PAGE + LC / MS-MS	Tecido LCM		-	Não realizada	CHA <i>et al.</i> , 2010.
HPLC / MALDI-TOF MS	Tecido	Biomarcadores de estratificação: Tumor RH+ vs. RH-	PTMA	Val: IHC	TRAUB <i>et al.</i> , 2006.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido LCM		PGRMC1	Val: IFA	NEUBAUER <i>et al.</i> , 2008.
1D-PAGE + LC / MS-MS	Tecido LCM		LIPA1, ARRB1, FSCN1 e EIF4G2	Val: IHC	REZAUL <i>et al.</i> , 2010.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido LCM		SODC, RBP1, GDIR1, LEG1, UPP2, RABP1, S10AB e NDKA	Ver: WB	SAHAB <i>et al.</i> , 2010
2D-PAGE, LC / FTICR MS	Tecido		A1AT	Ver: WB	SEMAAN <i>et al.</i> , 2012.
2D LC / MS-MS	Linhagem celular	ABAT, PDZK1	Val: <i>Targeted</i> MS	PAVLOU <i>et al.</i> , 2013.	
nanoLC / FTICR MS	Tecido LCM	Tumor RH+ e resposta ao tratamento	BASI, ENPP1 e EIF3E	Val: <i>Targeted</i> MS, IHC	UMAR <i>et al.</i> , 2009.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido		-	Não realizada	HODGKINSON <i>et al.</i> , 2012a.
Micro arranjo de anticorpo	Tecido		1433T e tBID	Ver: WB, IHC	HODGKINSON <i>et al.</i> , 2012b.
MS <i>imaging</i>	Tecido LCM	Tumor vs. Células epiteliais normais	S10A6 e S10A8	Val: IHC, TMA	SANDERS <i>et al.</i> , 2008.

DIGE: Eletroforese em gel diferencial; FTICR: *Fourier transform ion cyclotron resonance*; HPLC: LC de alta performance; IFA: Ensaio de imunofluorescência; IHC: Imunohistoquímica; LC: Cromatografia líquida; LCM: Microdissecção a laser; MS: Espectrometria de massas; MS-MS: MS em tandem; RH: Receptores hormonais; TMA: Micro arranjo de tecido; WB: *Western Blotting*; Verificação: N de 10-50; Validação: N acima de 100.



**TABELA 4:** Continuação.

Abordagem Proteômica	Tipo de Amostra	Propósito do estudo	Proteínas Candidatas	Validação / Verificação	Referência
2D-DIGE / MALDI-TOF MS	Tecido		Laminina, GSTP1 e HS90A	Val: IHC	DURÁN <i>et al.</i> , 2008.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido LCM		FASN, HSPB1, PGK1 e GLO	Val: WB, IHC	ZHANG <i>et al.</i> , 2005a.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido LCM	Tumor HER2+ vs. HER2-	K1C19	Val: RT-qPCR, RPPA e IHC	ZHANG <i>et al.</i> , 2005b.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido LCM		HNRH1, GRP78 e RKIP	Val: WB, IHC	ZHANG <i>et al.</i> , 2008.
2D-DIGE / MALDI-TOF MS	Tecido		K1C14, K2C7, GAPDH e PGK1	Ver: WB, IHC	SCHULZ <i>et al.</i> , 2009.
nanoLC / MS-MS	Linhagem celular		PLCG1, DOK1, STAT1 e CTND1	Ver: WB	BOSE <i>et al.</i> , 2006.
LC / MS-MS	Linhagem celular	Fosfoproteínas em HER2+	LYN, LCK e FYN	Val: Micro arranjo	REXER <i>et al.</i> , 2011.
nanoLC / MS-MS	Linhagem celular		EGFR, HER4, CDCP1, FAK1, PAXI, MAPK1, FA83A e EFS	Ver: WB, siRNA	BOYER <i>et al.</i> , 2012.
1D-PAGE + LC / MS-MS	GEM		Assinatura de 45 proteínas	Val: <i>in silico</i>	WARMOES <i>et al.</i> , 2012.
IHC em TMA	Tecido	Biomarcadores de estratificação: TN com alto e baixo potencial metastático	STAT1, PTEN, MK01, P38, P27, P21, SPB5, FAK1 e NEP	Não aplicável	CHARPIN <i>et al.</i> , 2009.
1D-PAGE + LC / MS-MS	Tecido		STAT1 e HG2A	Ver: WB, IHC	GREENWOOD <i>et al.</i> , 2012.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	GEM		HSP70 e 1433	Val: IHC	SUN <i>et al.</i> , 2008.

DIGE: Eletroforese em gel diferencial; GEM: Camundongo geneticamente modificado; IHC: Imunohistoquímica; LC: Cromatografia líquida; LCM: Microdissecação a laser; MS: Espectrometria de massas; MS-MS: MS em tandem; PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida; RPPA: *Reverse phase protein arrays*; RT-qPCR: PCR quantitativa em tempo real; TMA: Micro arranjo de tecido; TN: Triplo Negativo; WB: *Western Blotting*. Verificação: N de 10-50; Validação: N acima de 100.

**TABELA 4:** Continuação.

Abordagem Proteômica	Tipo de Amostra	Propósito do estudo	Proteínas Candidatas	Validação / Verificação	Referência
nanoLC / MS-MS	Plasma		-	Não realizada	NAKSHATRI <i>et al.</i> , 2009.
nanoLC / MS-MS	Plasma	Identificação de proteínas plasmáticas relacionadas aos subtipos moleculares	EGFR	Val: ELISA	PITTERI <i>et al.</i> , 2010.
nanoLC / MS-MS	Plasma		-	Não realizada	AMON <i>et al.</i> , 2012.
Micro arranjo de anticorpo	Plasma		-	Não realizada	GONZALEZ <i>et al.</i> , 2011.
Micro arranjo de anticorpo	Plasma		DUSP9, EED, EFNA5, ITGB1 e PPMT1	Val: Micro arranjo de anticorpo	LI <i>et al.</i> , 2012a.
2D-PAGE + LC / MS-MS	Tecido		Biomarcadores específicos	GLO1	Val: IHC, TMA
2D-PAGE / MS	Tecido	Biomarcadores de estratificação: Carcinoma Apócrino Invasivo	PGDH e ACMS1	Val: IHC, TMA	CELIS <i>et al.</i> , 2008; CELIS <i>et al.</i> , 2009.
2D-PAGE / MS	Fluido intersticial de tumor	Biomarcadores para detecção precoce	CALR, RABP2, CLIC1, EF1B, LEG1, PDIA2, PRDX2, PA1B2 e UBP5	Val: IHC, TMA	GROMOV <i>et al.</i> , 2010a.
2D-PAGE / MS	Tecido		GGCT	Val: IHC, TMA	GROMOV <i>et al.</i> , 2010b.
2D-PAGE / MS	Tecido	Biomarcadores de estratificação	K1C15 e DPYL3	Val: IHC	MOREIRA <i>et al.</i> , 2010
2D-PAGE / MS	Tecido	Biomarcador de lesão pré-maligna	K1C15 e K1C19	Val: IHC	CELIS <i>et al.</i> , 2007

DIGE: Eletroforese em gel diferencial; ELISA: Ensaio de imunoadsorção enzimática; IHC: Imunohistoquímica; LC: Cromatografia líquida; MS: Espectrometria de massas; MS-MS: MS em tandem; PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida; TMA: Micro arranjo de tecido; Verificação: N de 10-50; Validação: N acima de 100.

**TABELA 4:** Continuação.

Abordagem Proteômica	Tipo de Amostra	Propósito do estudo	Proteínas Candidatas	Validação / Verificação	Referência
2D-PAGE / MS	Tecido	Biomarcadores de tumor masculino	TPM4	Val: IHC	CHAHED <i>et al.</i> , 2008.
2D-PAGE / MS	Tecido LCM	Biomarcadores para CDIS	HSPB1, HS90A, ANXA5, PRDX2 e GRP78	Val: IHC	WULFKUHLE <i>et al.</i> , 2002.
LC / MS-MS	Tecido biópsia	Estratificação com base no prognóstico	K1C19, G3BP1/2	Val: IHC	HE <i>et al.</i> , 2011.
Enriquecimento de fosfoproteínas, LC / MS-MS	Linhagem celular	Fosfoproteínas em subtipo <i>basal-like</i>	EGFR Y1173, MET Y1234/35 e LYN	Val: RPPA, IHC	HOCHGRÄFE <i>et al.</i> , 2010.
MS <i>imaging</i>	Tecido biópsia	Biomarcador de prognóstico	DEF1 e DEF3	Val: IHC	BAUER <i>et al.</i> , 2010.
SELDI-TOF / MS	Tecido	Biomarcador de prognóstico	FRIL e UBB	Val: IHC	RICOLLEAU <i>et al.</i> , 2006.
LC / ESI MS-MS	Linhagem celular		COCA1, CEAM5 e NGAL	Val: WB	YEN <i>et al.</i> , 2014.
2D-nano UPLC / MS	Tecido		CD276	Val: IHC	TURTOI <i>et al.</i> , 2011.
LC / MS-MS	Linhagem celular	Biomarcadores por análise proteômica de membrana	LG3BP, LAMP1, RP1, EGFR e BRCA1	Não realizada	WHELAW <i>et al.</i> , 2009.
LC / MS-MS	Tecido		A1AT, AACT, APOD, SAMP, FBLN1, FBLN3, LUM, ZA2G, PIP, CO8A1, COEA1, MFAP4, ABCA8, ADA22 e TRYB1	Val: SRM / MRM	MURAOKA <i>et al.</i> , 2012.

CDIS: Carcinoma ductal *in situ*; DIGE: Eletroforese em gel diferencial; ESI: Ionização por *electrospray*; IHC: Imunohistoquímica; LC: Cromatografia líquida; LCM: Microdissecção a laser; MRM: Monitoramento de reações múltiplas; MS: espectrometria de massas; MS-MS: MS em tandem; PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida; RPPA: *Reverse phase protein arrays*; SELDI: *Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*; SRM: Monitoramento de reação selecionada; UPLC: LC e ultra performance; WB: *Western Blotting*; Verificação: N de 10-50; Validação: N acima de 100.

**TABELA 4:** Continuação.

Abordagem Proteômica	Tipo de Amostra	Propósito do estudo	Proteínas Candidatas	Validação / Verificação	Referência
nano LC / MS	Tecido	Biomarcadores TN por análise proteômica de membrana	HSPs, Queratinas, DRA, 1A23, ANXAs e EGFR	Val: WB	LU <i>et al.</i> , 2010b; LU <i>et al.</i> , 2010a.
2D-PAGE / ESI MS-MS	Tecido	Tumor vs. Linfonodo metastático	CAH1, ANXA5, PRDX6, PSA2, GRP78, PDIA1, TBB5, ENOA, TPIS, A1AT e MIF	Ver: IHC	THONGWATCHARA <i>et al.</i> , 2011.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Tecido		1433G, 1433T, K2C8, PSME2, SNAA, TPM4, TRFE, ALDH2 e GDIR2	Não realizada	MILIOLI <i>et al.</i> , 2015.
2D-PAGE / MS	Tecido	Biomarcadores TN	MAGA4	Val: IHC, TMA	CABEZON <i>et al.</i> , 2013.
LC / MS-MS	Tecido / fracionamento celular	Biomarcador de metástase óssea	ASPN, CD166 e SUSD2	Val: IHC	DUMONT <i>et al.</i> , 2012.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS	Linhagem celular	Biomarcador para tumor invasivo	ANXA2	Val: ELISA, RT-qPCR	JEON <i>et al.</i> , 2013.
2D-PAGE / MALDI-TOF MS-MS	Linhagem celular	Tumor vs Não tumoral	HPT e SPRC	Não realizada	TAN <i>et al.</i> , 2014.
2D-PAGE / MS	Tecido		HSPB1, TCPQ, PDIA1, ENPL, CAPZB, TBB5, TPIS, CAH1 e FABP4	Não realizada	CARCOFORO <i>et al.</i> , 2013.

ELISA:Ensaio de imunoadsorção enzimática; IHC:Imunohistoquímica; LC: Cromatografia líquida; MS:Espectrometria de massas; MS-MS:MS em tandem; PAGE:Eletroforese em gel de poliacrilamida; RT-qPCR:PCR quantitativa em tempo real; TMA:Micro arranjo de tecido; TN:Triplô Negativo; WB:*Western Blotting*; Verificação: N de 10-50; Validação: N acima de 100.

**TABELA 4:** Continuação.

Abordagem Proteômica	Tipo de Amostra	Propósito do estudo	Proteínas Candidatas	Validação / Verificação	Referência
MALDI-TOF MS	Soro	Biomarcador preditivo	Angiotensin II	Val: ELISA	BOCCARDO <i>et al.</i> , 2015.
LC / MS-MS	Tecido	Biomarcador de recorrência	BRCA2, GUAA, MMP12 e SIRBL	Val: SRM	SJÖSTRÖM <i>et al.</i> , 2015.
LC / MS-MS	Tecido e Linhagem celular	Perfil proteico de TN	STAT5A, FOXA1, TGFB1, PPM1A, POSTN, MYLK, e HLA-A	Val: IHC e CNV	LAWRENCE <i>et al.</i> , 2015.

CNV:Variação do número de cópias; ELISA:Ensaio de imunoadsorção enzimática; IHC:Imunohistoquímica; LC:Cromatografia líquida; MS:espectrometria de massas; MS-MS:MS em tandem; SRM:Monitoramento de reação selecionada; TN:Tripla Negativo; WB:*Western Blotting*; Verificação: N de 10-50; Validação: N acima de 100.

FONTE: Tabela adaptada de LAM *et al.*, 2014; GROMOV *et al.*, 2014; e MERMELEKAS & ZOIDAKIS, 2014.

### 2.4.1. Análise de expressão gênica

Em conjunto com a proteômica, as análises de expressão baseadas na quantificação do RNAm transcrito têm sido muito importantes para identificação de assinaturas moleculares para prognóstico e predição de tratamento dos pacientes. Apresenta vantagem em relação à proteômica no sentido de que permite a análise de várias amostras em um curto período de tempo, apresentando sensibilidade e rendimento elevados (OU *et al.*, 2008).

O controle das características biológicas celulares é atribuído aos genes, por isso, nada mais lógico do que abordar o genoma como alvo primário das explorações pelas bases moleculares de doenças (AZAD *et al.*, 2006). As análises de DNA e RNA através de técnicas como microarranjos, hibridização genômica comparativa (CGH), perda de heterozigose (LOH) e polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) são importantes na identificação de anormalidades genéticas e na descoberta de disfunções moleculares existentes nas células tumorais (SOMIARI *et al.*, 2005).

A caracterização molecular de tipos de câncer de mama confirmou a variabilidade existente nesta doença. Estudos de expressão de RNAm forneceram “assinaturas” ou “perfis” moleculares para distinguir pacientes com pior prognóstico e/ou desenvolvimento de tipos agressivos de tumor (ZAKHARCHENKO *et al.*, 2010).

FAN *et al.* (2006) realizaram uma análise de cinco métodos de identificação de perfis moleculares disponíveis comercialmente (por exemplo, subtipo intrínseco, classificador 70 genes, assinatura *wound healing*, *score* de recorrência e classificador dois genes) demonstrando que, com exceção de um deles, todos os demais testes possuem poder de discriminação semelhante e concordância de 77% a 80%. A combinação destes testes não resultou em melhores resultados, indicando que identificam as mesmas características moleculares através de marcadores diferentes. Contudo, a área de aplicação de estudos de expressão gênica é limitada. Os dados de transcriptoma podem até prever algumas situações, mas a expressão de RNAm não necessariamente resulta em alterações nas funções celulares (ZAKHARCHENKO *et al.*, 2010).

A dificuldade para a utilização de análises de expressão gênica no nível do RNAm no contexto de descoberta de biomarcadores proteicos é que geralmente não há concordância entre a abundância de uma proteína e os níveis do seu respectivo RNAm, sendo que esta diferença pode ser superior a 30 vezes o nível de um em relação ao outro (GYGI *et al.*, 1999; PRADET-BALADE *et al.*, 2001).

## 2.5. STIP1 (fosfoproteína induzida por estresse-1)

A proteína STIP1 atua como co-chaperona no complexo Hsp70-Hsp90 e foi selecionada para análises posteriores. Foram avaliadas a expressão do RNAm do gene *STIP1* e do nível da proteína em diferentes tecidos (tecido não tumoral, tumoral e linfonodo). Esta escolha deveu-se ao crescente interesse na literatura sobre a variação de expressão desta proteína em diferentes tipos de câncer, conforme apresentado na Tabela 5, porém com poucas informações em carcinomas mamários. Esta proteína é bastante estudada pelo grupo do Prof. Zanata (DE SOUZA *et al.*, 2014), do Departamento de Patologia Básica, que desenvolveu o anticorpo e gentilmente nos cedeu em colaboração.

Uma grande quantidade de proteínas é sintetizada em uma célula durante um curto espaço de tempo, e se seus resíduos hidrofóbicos estiverem expostos, elas podem formar agregados que acarretará na precipitação destas proteínas. A família das chaperonas moleculares tem a função de evitar que isto ocorra, facilitando o dobramento correto de outras proteínas em condições fisiológicas ou de estresse, o agrupamento conformacional e a degradação (MARTIN, 2004; KAMPINGA, 2006). As proteínas *heat shock* (Hsps) são classificadas de acordo com seu peso molecular e constituem a principal família de chaperonas (ODUNUNGA *et al.*, 2004).

A Hsp90 está principalmente envolvida na regulação conformacional e estabilização de proteínas que já estão praticamente com dobramento completo, enquanto a Hsp70 atua em estágios iniciais auxiliando o dobramento de proteínas recém sintetizadas ou desnaturadas (BAINDUR-HUDSON *et al.*, 2015). O início do ciclo de atuação destas duas chaperonas se dá pela captura de proteínas nascentes ou desnaturadas pela Hsp70 e uma das isoformas de Hsp40. Na fase seguinte há a formação de um complexo intermediário, onde a proteína alvo é transferida do

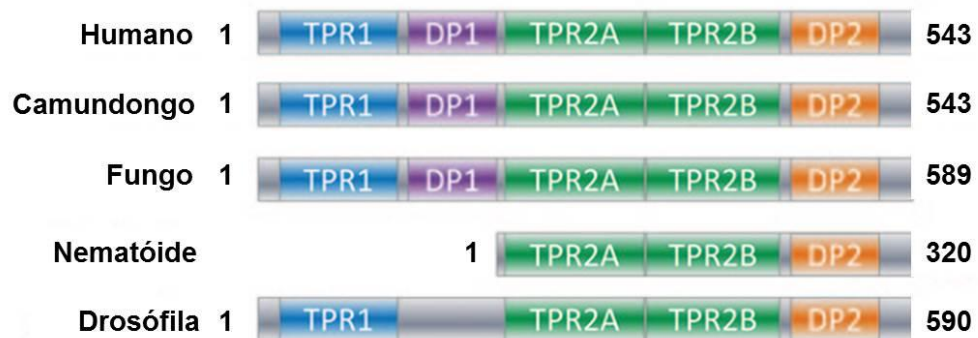
complexo Hsp70 para o complexo Hsp90. A progressão neste ciclo é regulada por várias co-chaperonas, por exemplo, a fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1), a ativadora de Hsp90 ATPase-1 (AHA1), CDC37 e p23 (CHANG *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2004; HILDENBRAND, *et al.*, 2010). STIP1 e CDC37 são co-chaperonas da fase intermediária, controlando a entrada de proteínas alvo na via, enquanto p23 e AHA1 atuam na fase final (maturação da proteína alvo) (LI *et al.*, 2012c)

Identificada em fungos por Nicolet e Craig em 1989 durante a busca por fatores de ação trans que induzissem a expressão de genes *heat shock*, a proteína STIP1 tem sido encontrada (ou predita) codificada no genoma de diversos organismos, inclusive em modelos para estudos genéticos em doenças humanas como, por exemplo, camundongo (BLATCH *et al.*, 1997), drosófila (GRIGUS *et al.*, 1998) e nematoides (SONG *et al.*, 2009). Em 1992, Honore e colaboradores isolaram a proteína homóloga humana, que possui 62 kDa, atua principalmente mantendo as proteínas *heat shock* 70 (Hsp70) e 90 (Hsp90) unidas e, por este motivo, também é chamada de HOP (*Hsp70/Hsp90-Organizing Protein*) (ODUNUNGA *et al.*, 2004). Outros trabalhos apontam para a função de STIP1 também como moduladora da atividade destas chaperonas (GROSS & HESSEFORT, 1996; CHANG *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1998; WEGELE *et al.*, 2003).

STIP1 é amplamente distribuída na célula, sendo encontrada no núcleo (LONGSHAW *et al.*, 2004), no complexo de Golgi (HONORE *et al.*, 1992), associada às membranas e no meio extracelular (HAJJ *et al.*, 2013), mas está localizada principalmente no citoplasma. STIP1 possui um potencial sinal para exportação do núcleo e a inibição deste sinal ocasiona o acúmulo da proteína no núcleo. É direcionada ao núcleo durante a transição G1/S quando fosforilada pela caseína quinase II, mas quando fosforilada pela quinase II do ciclo celular fica retida no citoplasma (LONGSHAW *et al.*, 2004). Por outro lado, PIAS1 (proteína inibidora de STAT1 ativada) foi descrita como um fator de retenção nuclear de STIP1 em linhagem celular de astrócitos (SOARES *et al.*, 2013). Apesar de ainda ser incerta a maneira como STIP1 é transportada para a membrana plasmática ou outros locais extracelulares, há evidências de que isso ocorra através de exossomos (HAJJ *et al.*, 2013).



STIP1, em mamíferos, é composta por três domínios TPRs (*Tetratricopeptide Repeat*), no qual TPR1 se liga à Hsp70 e TPR2 (A e B) à Hsp90, e dois domínios DP (*aspartate-proline*) (FIGURA 5). Os homólogos de STIP1 são definidos por nove motivos TPRs agrupados em domínios de três TPRs que medeiam as interações proteicas específicas em vários processos celulares, (HERNÁNDEZ *et al.*, 2002). A distinção entre Hsp70 e Hsp90 pelos motivos TRPs depende de afinidade e é regulada por fosforilação (MULLER *et al.*, 2013). A função dos dois motivos DP ainda não está clara.



**FIGURA 5: Estrutura de STIP1 em humanos e organismos modelo.** 1-porção N-terminal; números na extremidade C-terminal correspondem ao número de aminoácidos na proteína.

FONTE: Adaptado de BAINBUR-HUDSON *et al.*, 2015.

O gene *STIP1* está localizado no cromossomo 11q13.1 e nas proximidades encontra-se o gene *DNAJB1* (de Hsp40) e outros genes relacionados com o câncer (ODUNUNGA *et al.*, 2004).

Apesar de haver apenas estudos com linhagem celular sobre STIP1 em câncer de mama, esta proteína tem sido bastante estudada em outros tumores, como consta na Tabela 5.

**TABELA 5:** Funções de STIP1 no câncer.

Condição de STIP1	Sistema modelo	Função	Mecanismo biológico proposto	Referência
Extracelular	Linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e HT-1080	Migração celular / Invasão	Ativação de MMP2	SIMS <i>et al.</i> , 2011.
<i>Knockdown</i>	Linhagem de câncer de mama Hs578T	Migração celular	Ligação à actina	WILLMER <i>et al.</i> , 2013.
Inibição farmacológica	Proteínas isoladas e linhagem celular	Migração celular	Quebra da interação STIP1 / Hsp90	PIMIENTA <i>et al.</i> , 2011.
Complexo com Hsp70 e Hsp90	Câncer de cólon vs. Tecido não tumoral / linhagem celular	Não determinada	Aumenta formação do complexo	KUBOTA <i>et al.</i> , 2010.
Expressão aumentada, secretada	Linhagem celular de glioma	Proliferação celular	Ativação de via de sinalização (MAPK)	ERLICH <i>et al.</i> , 2007.
Expressão aumentada	CHC vs. Tecido não tumoral	Não determinada	Não determinado	SUN <i>et al.</i> , 2007.
Expressão aumentada	Linhagem celular de leucemia linfoblástica resistente a Bohemine vs. Sensível	Resistência à droga	Não determinado	SKALNIKOVA <i>et al.</i> , 2011.
Expressão aumentada, secretada	Câncer de ovário vs. Tecido não tumoral	Proliferação celular	Ativação de via de sinalização (ERK, ALK)	WANG <i>et al.</i> , 2010; TSAI <i>et al.</i> , 2012; CHAO <i>et al.</i> , 2013.
Expressão aumentada, <i>Knockdown</i>	Câncer pancreático vs. Tecido não tumoral; Linhagem celular invasora vs. Não invasora	Invasão celular	Ativação de MMP	WALSH <i>et al.</i> , 2009; WALSH <i>et al.</i> , 2011.
<i>Knockdown</i>	Linhagem celular endotelial HUVEC	Angiogênese (Migração celular)	Dinâmica do citoesqueleto (Ligação à actina)	LI <i>et al.</i> , 2012b.

NOTA: CM: Câncer de Mama; CHC: Câncer hepatocelular; MMP: Metaloproteinase de matriz.

FONTE: Adaptado de BAINBUR-HUDSON *et al.*, 2015.

### 3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é atualmente o quinto tipo de câncer com maior mortalidade no mundo e o segundo em incidência no sexo feminino. Contudo, poder-se-ia evitar um terço das mortes se a doença fosse detectada no estágio inicial. A mamografia, principal exame para a detecção, não permite a observação de tumores iniciais por serem muito pequenos, apesar de já conterem milhares de células. O diagnóstico tardio é um agravante para o prognóstico e dificulta o tratamento.

Diante deste quadro, métodos que propiciem a detecção precoce desta doença são objeto de diversos estudos. A caracterização de perfis proteicos e de proteínas diferenciais em amostras tumorais representa não apenas a possibilidade de obter um biomarcador proteico para diagnóstico, mas também de desenvolver terapias que tenham proteínas específicas como alvos. A constante atualização da classificação molecular do câncer de mama permite maior acurácia no prognóstico e nos aproxima de um tratamento individualizado. Portanto, com este trabalho pretendemos contribuir para a compreensão dos mecanismos básicos da doença e identificação de novos marcadores que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama.

#### 4. OBJETIVOS

- Detectar e identificar proteínas diferencialmente expressas entre amostras de tecido de mama não tumoral e tumoral provenientes da mesma paciente;
- Avaliar a expressão de RNAm de *STIP1* em tecido tumoral e do linfonodo metastático relativamente ao controle não tumoral;
- Comparar a expressão proteica de *STIP1* em amostras de tecido de mama tumoral, não tumoral e de linfonodo metastático.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Caracterização da amostra

Este estudo foi realizado com amostras de tecido coletadas no momento da cirurgia de 53 pacientes com câncer de mama, conforme apresentado na Tabela 6, atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba. Para análise proteômica foram utilizadas amostras de tecido mamário tumoral (T) e não tumoral (N) provenientes de cinco pacientes com carcinoma ductal invasor (Tabela 6). A média de idade destas pacientes foi de  $56,4 \pm 13,4$ . Para análise de expressão de RNAm de *STIP1* foram utilizadas 53 amostras de tecido de carcinomas mamários e oito amostras de linfonodo metastático (L). A análise de expressão proteica de *STIP1* por Western Blotting foi realizada com oito amostras para comparação N x T x L e dez amostras para comparação T x L. Todas as amostras foram obtidas após a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG, Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003.

### 5.2. Coleta e processamento das amostras

Após o procedimento cirúrgico, amostras de tecido mamário tumoral e de linfonodo foram selecionadas pelo patologista responsável antes de serem encaminhadas ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (UFPR). Fragmentos do tumor e linfonodo também foram acondicionados em tubos contendo *RNAlater®* (Ambion Inc. Applied Biosystems) para preservar o RNA até o momento da extração e garantir a qualidade do material para estudos da expressão gênica. Durante a cirurgia também foi retirada uma amostra de tecido mamário não-tumoral da mesma mama acometida pelo tumor, respeitando a margem de segurança, ou da mama contralateral. No laboratório, as amostras foram processadas para remoção de vasos sanguíneos e tecido adiposo que estivessem eventualmente aderidos. Os

tecidos foram fragmentados com tesoura e pinça e alocados em tubos de 1,5ml. Todas as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas a 80° C negativos. Todo o procedimento foi realizado com material estéril, no fluxo laminar e com luvas sem talco.

**TABELA 6:** Caracterização das 61 amostras utilizadas no estudo.

Amostra	Idade	Tipo histológico	Grau	Linfonodo Metastático	ER	PR	HER2	Metodologia
CP 617	65	Outros	-	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 622N CP 622T	71	CDI	I	Sim	pos	pos	-	2D-PAGE / WB
CP 624	46	CLI	II	Sim	pos	pos	neg	WB
CP 627	62	CDI	III	Sim	pos	pos	neg	WB
CP 630	50	CDI	I	Sim	-	-	-	WB
CP 633N CP 633T	70	CDI	-	Sim	pos	pos	neg	2D-PAGE
CP 641	58	CDI	II	Sim	neg	neg	pos	WB
CP 645N CP 645T	53	CDI	II	Sim	pos	pos	neg	2D-PAGE / WB
CP 649	44	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 652	47	CLI	I	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 653	62	CDI	II	Não	neg	neg	neg	RT-qPCR
CP 654	70	CLI	II	Sim	neg	neg	neg	RT-qPCR
CP 655N CP 655T	45	CDI	II	Sim	pos	pos	neg	2D-PAGE / WB / RT-qPCR
CP 672N CP 672T	43	CDI	II	Sim	pos	neg	neg	2D-PAGE / WB / RT-qPCR
CP 676	60	Outros	II	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 681	49	Outros	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 686	32	CDI	II	Sim	-	-	-	WB / RT-qPCR
CP 688	49	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 690	71	CDI	I	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 694	74	CDI	III	Não	neg	pos	neg	RT-qPCR
CP 696	-	CDI	-	Sim	-	-	-	RT-qPCR
CP 697	81	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 698	73	CDI	II	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 704	45	CDI	I	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 705	39	CDI	II	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 708	89	CDI	III	Sim	neg	neg	pos	WB / RT-qPCR
CP 717	61	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 719	43	CLI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR

NOTA: N-não tumoral; T-tumor; ER-receptor de estrogênio; PR-receptor de progesterona; HER2-receptor de fator de crescimento epidermal 2; CDI-carcinoma ductal invasivo; CLI-carcinoma lobular invasivo.

TABELA 6: Continuação.

Amostra	Banda	Tipo histológico	Grau	Linfonodo metastático	ER	PR	HER2	Metodologia
CP 723	59	Outros	II	-	pos	pos	pos	RT-qPCR
CP 726	81	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 727	58	CDI	II	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 728	42	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 733	34	CDI	III	Sim	neg	neg	-	RT-qPCR
CP 736	50	CDI	II	Sim	neg	neg	neg	RT-qPCR
CP 740	57	Outros	I	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 749	-	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 753	40	CDI	III	Não	-	-	-	RT-qPCR
CP 754	39	CDI	III	Sim	-	-	-	RT-qPCR
CP 760	38	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 762	65	CDI	I	Não	-	-	-	RT-qPCR
CP 766	41	CDI	-	-	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 774	45	CDI	I	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 777	73	Outros	-	Não	-	-	-	RT-qPCR
CP 778	27	CDI	II	Sim	pos	neg	pos	RT-qPCR
CP 779	66	CDI	III	Não	neg	neg	neg	RT-qPCR
CP 781	38	CDI	II	Não	neg	neg	-	RT-qPCR
CP 782	34	CLI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 783	80	CLI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 784	42	CDI	II	Não	pos	pos	pos	RT-qPCR
CP 788	63	CDI	III	Sim	pos	pos	-	RT-qPCR
CP 789	48	CDI	II	Não	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 791	-	CDI	III	Não	neg	neg	neg	RT-qPCR
CP 805T	70	CDI	III	-	neg	neg	-	RT-qPCR
CP 805L								RT-qPCR
CP 806T	48	Outros	-	-	pos	pos	-	RT-qPCR
CP 806L								RT-qPCR
CP 815	58	CDI	I	Não	pos	neg	pos	RT-qPCR
CP 818T	-	CDI	I	Não	pos	pos	-	RT-qPCR
CP 818L								RT-qPCR
CP 825T	41	Outros	-	Sim	neg	neg	neg	RT-qPCR
CP 825L								RT-qPCR
CP 837T	76	CDI	II	-	-	-	-	RT-qPCR
CP 837L								RT-qPCR
CP 840T	63	CDI	III	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 840L								RT-qPCR
CP 843T	49	CDI	II	Sim	pos	pos	neg	RT-qPCR
CP 843L								RT-qPCR
CP 865T	72	CDI	II	Não	-	-	-	RT-qPCR
CP 865L								RT-qPCR

NOTA: T-tumor; L-linfonodo; ER-receptor de estrogênio; PR-receptor de progesterona; HER2-receptor de fator de crescimento epidermal 2; CDI-carcinoma ductal invasivo; CLI-carcinoma lobular invasivo.

FONTE: O autor (2015).

### 5.3. Análise proteômica

#### 5.3.1. Extração proteica

Para extração e solubilização das proteínas, as amostras de tecido (entre 100 e 400mg dependendo da disponibilidade) foram transferidas para tubos de 2ml e acrescidas de 1ml tampão de lise (7M Uréia, 2M Tiuréia, 4% CHAPS, 40mM Tris e 0,2% inibidor de protease PMSF). A desagregação do tecido e a homogeneização foram realizadas no próprio tubo com um homogeneizador elétrico. Durante todo o processo as amostras ficaram em banho de gelo para preservar a integridade do material. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos a 4° C (microcentrífuga refrigerada 1457r – *Eppendorf*) resultando em um sobrenadante com as proteínas extraídas.

#### 5.3.2. Dosagem de proteínas

A quantificação de proteína total do extrato foi feita a partir do método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o reagente *Bio-Rad Protein Assay*, que se baseia na ligação do corante *Coomassie® Brilliant Blue G-250* com a proteína. Após a ligação às proteínas, ocorre uma mudança no perfil cromático entre 465-595nm, observada devido à estabilização da forma aniônica do corante. A maioria do sinal observado deve-se à interação com resíduos de arginina, resultando no padrão de variação característico dos ensaios Bradford. Esses perfis cromáticos são comparados com os perfis de diferentes concentrações de uma proteína padrão. A albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*, BSA) foi utilizada como padrão nas reações deste trabalho.



### 5.3.3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

#### *Reidratação e Isoeletrofocalização*

Foram utilizadas tiras de IPG (*immobilized pH gel*) de 13cm de comprimento (130x3x0,5mm; GE Healthcare) com gradiente de pH de 4-7. As tiras foram reidratadas passivamente por 16 horas em temperatura ambiente no *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* (GE Healthcare) com tampão de Reidratação (7 M Uréia, 2M Tiuréia e 2% CHAPS, sendo adicionado 50mM DTT e 0,5% IPG *buffer* apenas no momento do uso). Ao tampão foram misturados 1000µg de proteína total da amostra atingindo um volume final de 250µl. As tiras foram cobertas com óleo mineral (*DryStrip Cover fluid* / GE Healthcare) para evitar ressecamento.

Para a isoeletrofocalização (IEF), processo no qual as proteínas são separadas com base no ponto isoelétrico (pI), as tiras foram transferidas para uma placa de cerâmica (*Manifold* – GE Healthcare) e submetidas ao programa de focalização, descrito na Tabela 7, no aparelho *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare). Após a IEF as tiras foram armazenadas a -80°C por no máximo 5 dias até a utilização.

**TABELA 7:** Programa utilizado na isoeletrofocalização das tiras pH 4-7.

ETAPA	VOLTAGEM (V)	TEMPO (h)	kV/h
1	500	1:00	0,5
2	1000	1:00	0,8
3	8000	2:30	11,3
4	8000	0:30	4,1
Total	17500	5:00	16,7

FONTE: Adaptado de GE Healthcare Handbook, 2-D Electrophoresis Principles and Methods (2005).

#### *Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE)*

Previamente à SDS-PAGE, as tiras foram equilibradas em 5ml de tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl – pH 8,8; 6M Uréia; 30% Glicerol; 2% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e um traço de azul de bromofenol) e 50mM DTT (Ditiotreitol) por 15 minutos sob leve agitação a temperatura ambiente. Em seguida foram equilibradas por mais 15 minutos, sob as mesmas condições, em tampão de equilíbrio acrescido

de 4,5% de iodoacetamida (responsável por alquilar grupos tiol prevenindo reoxidações durante a eletroforese).

Após o equilíbrio, as tiras foram brevemente submersas 3 vezes em tampão de corrida (25mM Tris-base, 192mM glicina e 0,1% SDS) para remover o excesso de tampão de equilíbrio e, em seguida, posicionadas horizontalmente sobre um gel de poliacrilamida a 10% com dimensões de 18cm x 16cm. Oito microlitros de marcador de massa molecular (LMW) entre 14 e 97kDa (*LMW-SDS Marker Kit* - GE Healthcare) foram aplicados em papel filtro posicionado adjacente à extremidade de pH 4 da tira. As tiras e o LMW foram selados com agarose 1% em tampão de corrida. Para que a frente de migração fosse visível, foram acrescentados traços de azul de bromofenol à solução de agarose.

A eletroforese ocorreu em tampão de corrida sob temperatura de 11°C, mantida por refrigeração com circulador termostático *Multitemp II*, utilizando o sistema eletroforético *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare). Para que a passagem das proteínas da tira para o gel de poliacrilamida ocorra de maneira suave e homogênea, a eletroforese foi desenvolvida a 15mA/gel nos 30 minutos iniciais. O restante da corrida ocorreu a 30mA/gel, sendo interrompida quando a frente de migração atingiu aproximadamente 1cm do limite inferior do gel. Todas as etapas e soluções utilizadas no 2D-PAGE foram seguidas ou adaptadas a partir do protocolo fornecido pelo fabricante do aparelho (*2-D Electrophoresis Principles and Methods*, 2005).

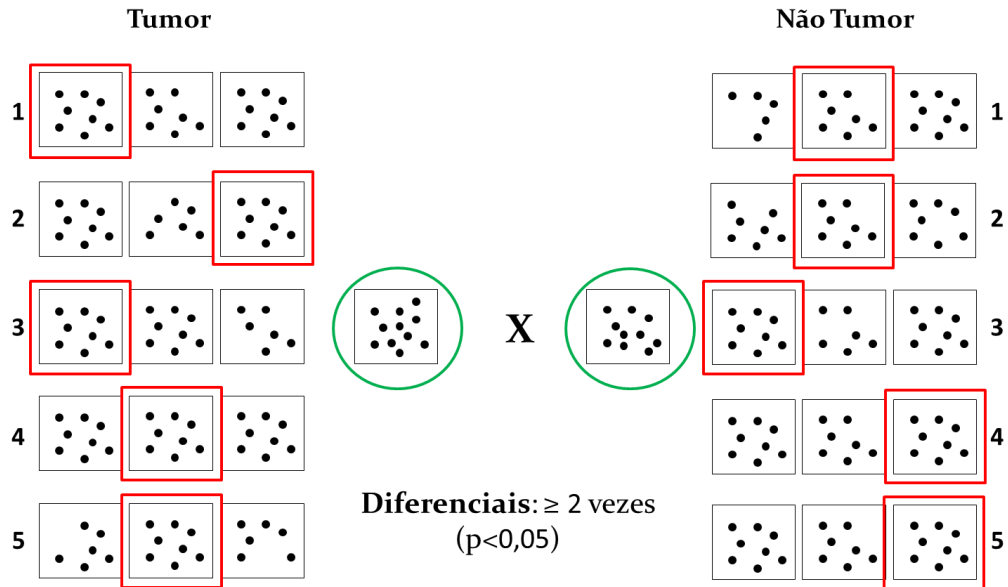
#### *Coloração, Digitalização e Análise Computacional*

Para a fixação das proteínas, os géis permaneceram durante uma hora, sob leve agitação, em solução contendo 1,3% de ácido orto-fosfórico 85% e 20% de metanol. Foi utilizada a coloração com *Coomassie* coloidal adaptada de Westermeier (2006). Os géis ficaram submersos em 300ml de solução corante (1,5% de ácido orto-fosfórico 85%, 7,7% de sulfato de amônio e 0,01% de *Coomassie* G-250) sob leve agitação por um período de 16 a 20 horas. Para permanecerem apenas com as marcações das bandas, os géis foram descorados em água destilada, também sob leve agitação, e armazenados a 4 °C em solução 1% de ácido acético.

Os géis de eletroforese bidimensional foram digitalizados no *ImageScanner™ II* (GE Healthcare) e analisados com o programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE

Healthcare) para identificação das bandas diferenciais. Após a detecção automática, as bandas foram checadas manualmente. Para o pareamento (*matching*) correto do programa entre as replicatas da mesma amostra e entre tecido tumoral e não tumoral, foram selecionadas três bandas de referência, claramente comuns às duas amostras, denominadas *landmarks*. Os resultados do pareamento foram conferidos um a um. O ponto isoelétrico e a massa molecular foram plotados em coordenadas x e y nos géis bidimensionais, utilizando respectivamente a faixa de pH da tira e as bandas do marcador de massa.

Os géis das amostras de tecido tumoral e não tumoral de cada paciente foram feitos em triplicata. Conforme representado na Figura 6, um gel foi escolhido para servir de gel de referência para o pareamento em cada triplicata, sendo levado em consideração o número de bandas detectadas pelo programa e a resolução das mesmas no gel. Para o pareamento (*matching*) correto entre as replicatas da mesma amostra e entre tecido tumoral e não tumoral, foram selecionadas três bandas de referência, claramente comuns às duas amostras, denominadas *landmarks*. Com as triplicatas pareadas, foi feita comparação entre os géis referência de cada amostra tumoral e não tumoral, obtendo assim as bandas diferenciais provenientes da comparação entre os dois tecidos da mesma paciente. Dentre os cinco géis referência do tecido tumoral um foi escolhido como Master para pareamento entre eles, sendo feito o mesmo para as amostras não tumorais. Após o pareamento, estes géis Master de tecido tumoral e não tumoral foram analisados em relação à diferença de expressão.



**Figura 6: Representação esquemática dos géis referência e pareamento para análise.** Os números de 1 a 5 indicam as amostras feitas em triplicata. Os géis de referência para cada triplicata estão destacados em vermelho e o gel Master (escolhido entre os géis de referência) para cada tipo de tecido está destacado em verde.

FONTE: O autor (2015).

O programa utiliza como parâmetro para a análise estatística o volume relativo das bandas proteicas. A normalização do volume das bandas detectadas considera o volume total das bandas, na qual o volume de cada banda é dividido pelo volume total das bandas detectadas e multiplicado por 100. Foram consideradas apenas as bandas cuja diferença de expressão foi maior ou igual a 2 vezes. Para estas bandas foi aplicado o teste *t de Student*, de acordo com o indicado no manual do fabricante (*ImageMaster 2D Platinum 6.0 User Manual – GE Healthcare*), considerando como bandas diferencialmente expressas as que apresentaram uma variação estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 5.3.4. Espectrometria de massas

##### *Preparo das Amostras*

As bandas de interesse foram excisadas manualmente do gel utilizando ponteiros novas estéreis tipo P1000 e colocadas em tubos tipo *ependorf* (0,5ml) contendo 400 $\mu$ l de solução para descorar (50% de acetonitrila, 25mM de bicarbonato

de amônio) por uma hora. Este procedimento foi repetido até a completa descoloração. Em seguida, foram submetidas a duas etapas de desidratação com 100µl de acetonitrila 100% por 4 minutos cada. A acetonitrila foi descartada e os fragmentos de gel ficaram por uma hora secando a temperatura ambiente, sendo posteriormente armazenados a 20°C negativos até serem submetidos à digestão trípica.

Para a digestão proteolítica *in gel*, os fragmentos de gel foram reidratados por 30 minutos, em banho de gelo, com 20µl de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega*) (15ng/µl em tampão contendo 40mM bicarbonato de amônio e 10% acetonitrila) Após esse período, a digestão ocorreu a 37° C por 16 a 20 horas. Para aperfeiçoar a extração dos peptídeos do gel, foi realizada uma etapa de concentração. O sobrenadante da digestão (20ul) foi removido para um tubo de 0,5ml. O fragmento de gel foi submerso em 20ul de solução de ácido trifluoroacético (TFA) 5% / acetonitrila 50% e ficou sob agitação por 30min para extrair os peptídeos. Esta solução foi removida e colocada no mesmo tubo com o sobrenadante da digestão. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando um volume de 60ul. As amostras foram concentradas no *Speed Vac* por 1 hora restando cerca de 5ul. Quando a amostra secou completamente foi ressuspensa em 4ul de TFA 0,1%. A solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução de 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético saturada com matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) e 2µl foram aplicados na placa para MALDI (*scout MTP MALDI ion source 384 target - Bruker Daltonics*).

Quando não foi possível identificar apenas com o procedimento de concentração descrito, foi feito um passo adicional para purificação peptídica utilizando uma ponteira com coluna de fase reversa (*PerfectPure C-18 Tip – Millipore*). A ponteira foi pré-umidificada duas vezes com 10µl de solução de 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético e equilibrada duas vezes com 10µl de solução de 0,1% de ácido trifluoroacético. Em seguida, a amostra foi aspirada e expelida cerca de dez vezes, sempre evitando a passagem de ar pela coluna de fase reversa. A amostra foi lavada cinco vezes novamente com solução de 0,1% de ácido trifluoroacético para retirar contaminantes. Os peptídeos foram eluídos diretamente em tubo de 0,2ml contendo 2µl da mesma solução saturada com matriz HCCA e aplicados na placa para o MALDI.

### *Obtenção e Análise dos Espectros de Massa*

As massas dos peptídeos tripticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo *Autoflex II* (*Bruker Daltonics*). O programa de computador utilizado foi o *FlexControl 2.0* (*Bruker Daltonics*). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20kV, intervalo de 150ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200Da. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (ACTH 1-17, ACTH 1-24, ACTH 18-39, angiotensina I, angiotensina II e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50Da e 2211,10Da) quando presentes. Para análise e tratamento dos espectros foi utilizado o programa *FlexAnalysis 2.0* (*Bruker Daltonics*).

### *Identificação das Proteínas*

As proteínas foram identificadas por PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) e/ou por MS/MS utilizando o programa MASCOT (*Matrix Science, UK* - [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) associado ao uso do banco de dados *Swiss-Prot*. Os parâmetros de busca utilizados foram: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância de erro utilizada foi de no máximo 200 ppm (partes por milhão).

Os nomes e siglas utilizados para as proteínas são os sugeridos no banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot* (<http://www.uniprot.org/>). Os respectivos genes foram representados pelas siglas oficiais de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

## 5.4. Análise de expressão gênica

### 5.4.1. Extração do RNA total e retrotranscrição

A extração do RNA total das amostras tumorais, não-tumorais e de linfonodo foi realizada com o kit de extração de RNA *RNAeasy*<sup>®</sup> (Qiagen), seguido de tratamento com DNase (para evitar uma possível contaminação com DNA), e posterior armazenamento a -80°C. Cerca de 200 ng dos RNAs obtidos foram aplicados em gel de agarose 2%. Este foi corado com brometo de etídeo para análise da integridade. As concentrações dos RNAs foram determinadas utilizando o aparelho *Nanodrop*<sup>®</sup> 2000. A retrotranscrição de 1200 ng de RNA para síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) no equipamento *Mastercycler gradient* (Eppendorf).

### 5.4.2. Análise de RT-qPCR para *STIP1*

A análise foi realizada por quantificação relativa através do método  $\Delta\Delta C_t$  (XIA *et al.*, 2010). Neste método obtemos a expressão de determinado gene alvo estabelecendo uma relação com uma amostra de referência. As reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) ocorreram no equipamento Vii7 (Applied Biosystems) utilizando o sistema de detecção por sonda de hidrólise fluorescente Taqman<sup>®</sup> FAM-MGB. Os genes *ACTB* e *GAPDH* foram utilizados como controle endógeno da reação, tendo sido pré-selecionados através de ensaio com cartão microfluídico de 384 poços *Taq Man Low Density Endogenous Control Panel* (TLDA – *Taq Man Low Density Array*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Um pool de amostras de tecido mamário não tumoral foi utilizado como calibrador, ao qual é atribuído o valor de expressão igual a 1,0.

As reações na placa de RT-qPCR seguiram o protocolo *TaqManGene Expression Assays* e o *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para cada amostra foi realizado uma reação composta por: 5,0µL de Master Mix, 2µL de cDNA, 0,5 µL do *Gene Expression Assay* (*ACTB*; *GAPDH*; *STIP1*), e 2,5µL de

água ultra pura, totalizando 10 µL de volume de reação. Todas as amostras, incluindo o calibrador, foram analisadas em triplicatas na placa.

## **5.5. Análise da expressão de STIP1**

### **5.5.1 SDS-PAGE**

Esta técnica foi utilizada para a separação eletroforética das proteínas totais em géis de 1.0 mm. Para o gel de empilhamento utilizou-se solução a 5% de acrilamida/bis-acrilamida em tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8 contendo 0,4% de SDS. Para o gel de separação, foi utilizado uma concentração de 10% de acrilamida/bis acrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) contendo 0,4% de SDS. Agentes catalizadores foram utilizados para promover a polimerização dos géis, 0,1% APS (Persulfato de Amônio) e 0,01% de TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina) adicionados logo antes da aplicação.

Trinta microgramas de proteína total de cada amostra foram misturados com tampão de amostra redutor (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, 0,2% de SDS, 10% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol e 50 mM de 2-mercaptoetanol) e fervidas por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. A corrida foi feita a 10 mA/gel até a entrada das proteínas no gel de separação e então aumentado para 15 mA/gel até que a frente de migração atingisse o limite inferior do gel. Cinco microlitros do marcador de massa *LMW-SDS Marker Kit* (GE Healthcare) foi utilizado para determinação da massa das proteínas de interesse. Para cada amostra foram feitos géis em duplicata.

### **5.5.2. Western-Blotting**

Terminada a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE Piscataway, NJ) no aparelho *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) com tampão de transferência (192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol) por 45 minutos a 10V. A eficiência da transferência foi verificada após coloração da membrana com vermelho



de Ponceau (0,2% de corante, 3% de ácido acético glacial). As membranas foram lavadas com TBS-T (120 mM de NaCl, 20 mM de Tris e 0,05% de Tween 20) até completa remoção do corante e então incubadas com 5 ml de TBS-T/leite (TBS-T contendo 5% de leite liofilizado, desnatado e desengordurado - Molico, Nestlé) por uma hora para bloqueio dos sítios livres. As membranas foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 4° C em 4 ml de solução de anticorpo primário anti-STIP1 (DE SOUZA *et. al*, 2014) e TBS-T/leite na proporção de 1:3000. Após incubação, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos cada em TBS-T para posterior cobertura das membranas em 4 ml de solução de anticorpo secundário anti-coelho HRP (GE Healthcare) e TBS-T/leite na proporção de 1:500 por uma hora a temperatura ambiente. Dois normalizadores foram testados, beta actina e vinculina, tendo esta última sido selecionada para o experimento final. Para o normalizador, as membranas incubadas com o anticorpo primário anti-vinculina (Sigma-Aldrich) 1:10.000 e o anti-secundário anti-camundongo HRP (Sigma-Aldrich).

Para reação de *Western-Blotting*, as membranas foram lavadas outras 3 vezes de 5 minutos em TBS-T, alocadas sobre uma folha plástica em cassete fotográfico e cobertas com 1 ml de substrato quimioluminescente (GE Healthcare) por cerca de 5 minutos para ser então coberta por outra folha plástica. O excesso do substrato foi removido e, em quarto escuro, a membrana foi exposta a um filme autoradiográfico (Kodak) por tempos determinados até a obtenção do sinal, este verificado após revelação e fixação do filme.

### 5.5.3. Digitalização e densitometria

Os filmes fotográficos resultantes do WB foram digitalizados em resolução de 300 dpi. As bandas foram submetidas à densitometria com o uso do programa *ImageJ* (SCHNEIDER *et al.*, 2012) que atribui um valor numérico para cada uma. O valor de cada banda de STIP1 foi dividido pelo valor da banda correspondente do normalizador (vinculina).

## 5.6. Análise estatística

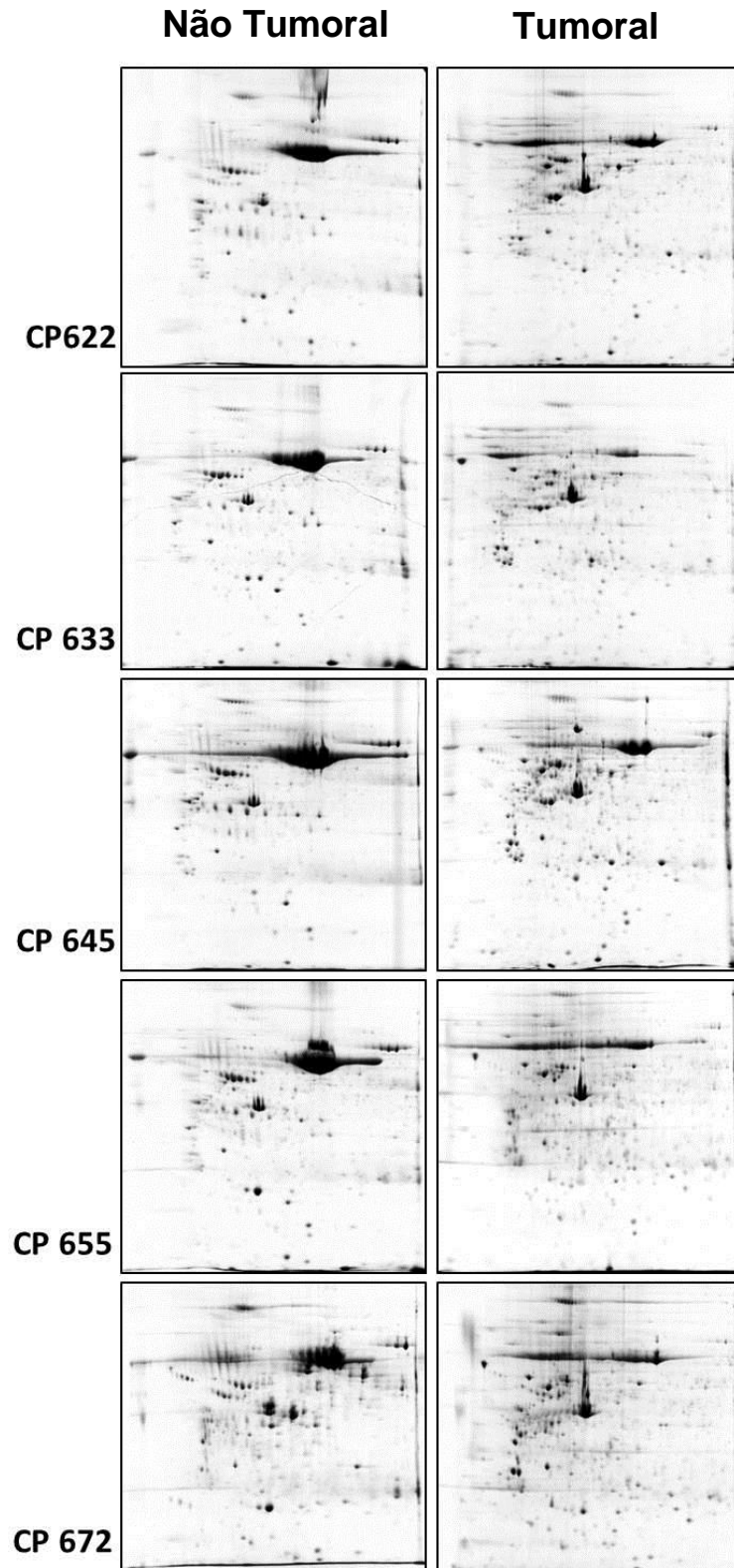
A razão entre os quadrados médios foi avaliada pelo teste  $F$  a 0,025 de significância. A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Bartlett. A significância das diferenças entre as médias foi avaliada pelo teste  $t$  de Student. Todos os cálculos foram realizados de acordo com as fórmulas apresentadas por Beiguelman (1988).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análise proteômica comparativa

Neste trabalho, descrevemos as proteínas diferencialmente expressas obtidas a partir da comparação entre tecido de tumor mamário e seu tecido não tumoral correspondente (tecido removido do lado oposto da mama onde o tumor estava localizado e confirmado por patologista como tecido livre de tumor) provenientes de cinco pacientes diagnosticados com carcinoma ductal invasor. As amostras pareadas foram comparadas para observar diferenças individuais nos perfis de expressão proteica (FIGURA 7). Os 30 géis de tecido não tumoral apresentaram média de  $630 \pm 100,6$  bandas, enquanto os 30 géis de tecido tumoral apresentaram  $970 \pm 285,9$  bandas. A média detectada de bandas diferenciais e proteínas identificadas nas cinco amostras foi de 85,2 e 53,4 (62,7%), respectivamente (TABELA 8). Os resultados apontaram 161 bandas identificadas correspondendo a 115 proteínas distintas: 33 bandas (24 proteínas distintas) com expressão reduzida e 128 bandas (91 proteínas distintas) com expressão aumentada no tecido tumoral (TABELA 9). Cinco proteínas, vimentina (VIME), peroxirredoxina-2 (PRDX2), glutathione S-transferase P (GSTP1), proteína de ligação a NSF solúvel alfa (SNAA) e alfa-1-antitripsina (A1AT) foram identificadas em ambos os tecidos, mas não em bandas correspondentes, reduzindo o número total de proteínas de 115 para 110.

Todos os dados obtidos para as identificações, bem como a classe funcional a qual cada proteína pertence constam dos APÊNDICES 1 e 2. A variação esperada para os valores de MM e pI ( $\Delta MM < 20\%$  e  $\Delta pI < 0,6$ ) foi estipulada de acordo com CARON e colaboradores (2002), sendo que as modificações pós-traducionais (PTMs) e isoformas geradas por *splicing* alternativo podem eventualmente extrapolar essa margem.



**FIGURA 7: Géis de referência de tecido não tumoral e tecido tumoral de cada paciente.**

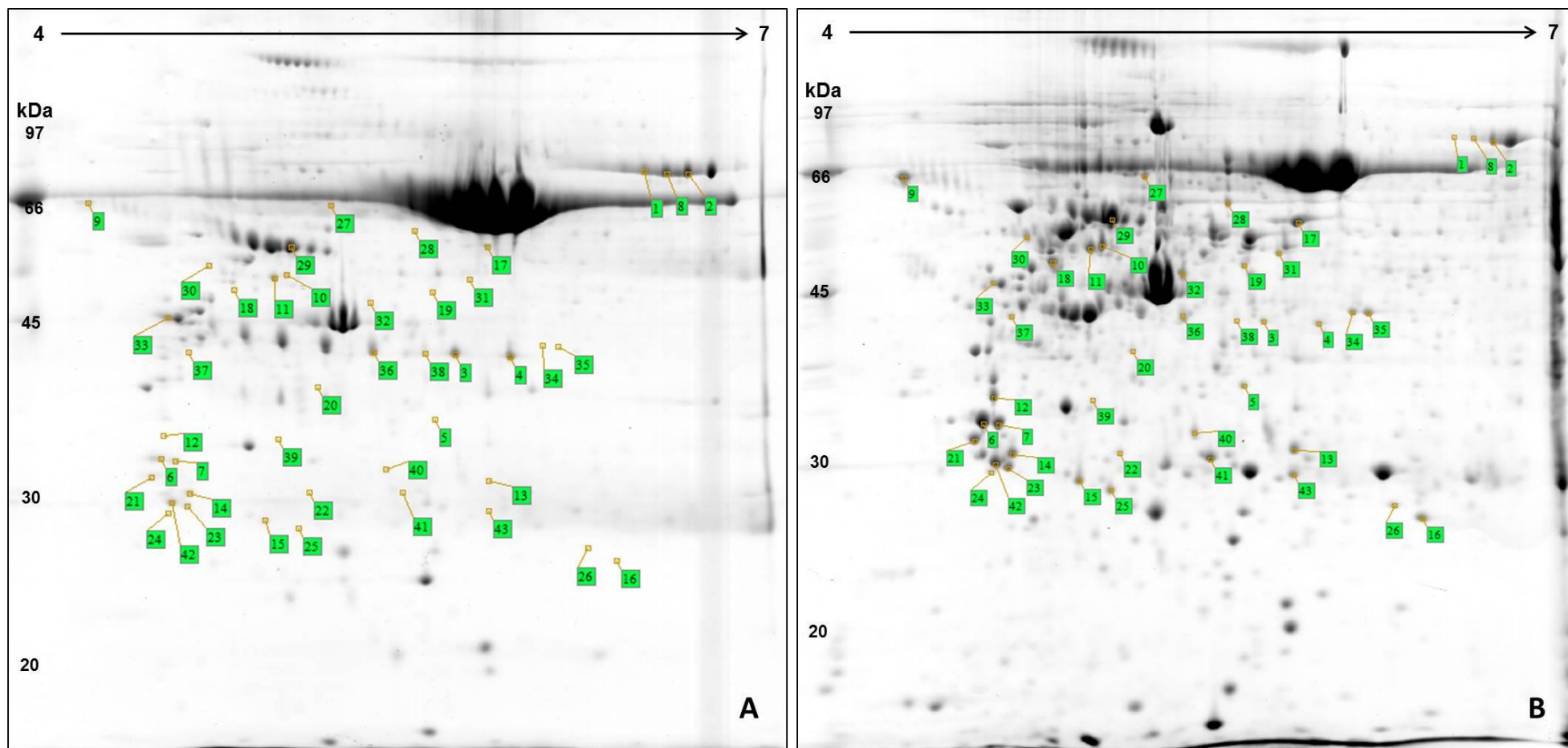
FONTE: O autor (2015).

**TABELA 8:** Total de bandas com expressão diferencial acima de 2 vezes ( $p < 0,05$ ) para cada amostra pareada.

<b>Código paciente</b>	<b>Bandas expressas diferencialmente</b>	<b>Bandas identificadas</b>
CP 622	76	36 (47%)
CP 633	94	62 (66%)
CP 645	84	60 (71%)
CP 655	87	52 (59%)
CP 672	85	57 (67%)
<b>MÉDIA</b>	<b>85,2</b>	<b>53,4 (62,7%)</b>

FONTE: O autor (2015).

Deste montante, destacamos as sete bandas diferencialmente expressas comuns às cinco amostras, nove presentes em quatro amostras, dez presentes em três amostras e 17 encontradas em duas amostras, totalizando 43 bandas proteicas (37 proteínas distintas) (FIGURA 8).



**FIGURA 8: Géis de referência da amostra CP 645.** (A) Tecido não tumoral e (B) tumoral. Em destaque, a localização das 43 bandas (35 proteínas distintas) diferencialmente expressas presentes em ao menos duas amostras. A numeração das bandas segue a Tabela 9.

FONTE: O autor (2015).

**TABELA 9:** Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir da análise comparativa entre amostras de tecido mamário tumoral e não tumoral.

Amostra	Banda	Proteína	Código Swiss-prot	Gene (UniGene)	Fold change
Todas as amostras	1*	TRFE - Sorotransferrina	P02787	<i>TF</i>	8.3
	2*	TRFE - Sorotransferrina	P02787	<i>TF</i>	2.1
	3*	FIBB - Fibrinogênio cadeia beta	P02675	<i>FGB</i>	4.9
	4*	FIBB - Fibrinogênio cadeia beta	P02675	<i>FGB</i>	3.9
	5	IPYR - Pirofosfatase inorgânica	Q15181	<i>PPA1</i>	2.2
	6	TPM4 - Tropomiosina cadeia alfa-4	P67936	<i>TPM4</i>	6.6
	7	TPM3 - Tropomiosina cadeia alfa-3	P06753	<i>TPM3</i>	4.6
Ao menos em 4 amostras	8*	TRFE - Sorotransferrina	P0287	<i>TF</i>	5.1
	9	CALR - Calreticulina	P27797	<i>CALR</i>	3.4
	10	PDIA6 - Proteína dissulfeto isomerase A6	Q15084	<i>PDIA6</i>	5.7
	11	ATPB - ATP sintase subunidade beta, mitocondrial	P06576	<i>ATP5B</i>	2.5
	12	TPM1 - Tropomiosina cadeia alfa-	P09493	<i>TPM1</i>	16.5
	13	PSME1 - Complexo ativador do proteassoma subunidade 1	Q06323	<i>PSME1</i>	2.3
	14	1433G - Proteína 14-3-3 gama	P61981	<i>YWHAG</i>	2.4
	15	GDIR1 - Inibidor de dissociação Rho GDP 1	P52565	<i>ARHGDI1</i>	2.6
16	PARK7 - Proteína DJ-1	Q99497	<i>PARK7</i>	3.2	
Ao menos em 3 amostras	17	PDIA3 - Proteína dissulfeto isomerase A3	P30101	<i>PDIA3</i>	4.1
	18	ENOG - Enolase gama	P09104	<i>ENO2</i>	2.1
	19	QCR1 - Complexo citocromo b-c1 subunidade 1, mitocondrial	P31930	<i>UQCRC1</i>	2.3
	20	SEC13 - Proteína SEC13 homóloga	P55735	<i>SEC13</i>	2.8
	21	1433E - Proteína 14-3-3 epsilon	P62258	<i>YWHAE</i>	3.9
	22	PSA3 - Proteassoma subunidade alfa tipo-3	P25788	<i>PSMA3</i>	3.8
	23	1433E - Proteína 14-3-3 epsilon / 1433Z - Proteína 14-3-3 zeta-delta	P62258 / P63104	<i>YWHAB / YWHAZ</i>	2.7
	24	PSA5 - Proteassoma subunidade alfa tipo-5	P28066	<i>PSMA5</i>	2.6
	25	GDIR2 - Inibidor de dissociação Rho GDP 2	P52566	<i>ARHGDI2</i>	3.3
	26	PRDX3 - Peróxido redutase dependente de tioredoxina, mitocondrial	P30048	<i>PRDX3</i>	2.6
Ao menos em 2 amostras	27	PLSL - Plastina - 2	P13796	<i>LCP1</i>	2.4
	28	TCPE - Proteína complex-T 1, subunidade epsilon	P48643	<i>CCT5</i>	4.0
	29	TBA1B - Tubulina cadeia alfa-1B	P68363	<i>TUBA1B</i>	5.7
	30	A1AT - Alfa-1-antitripsina	P01009	<i>SERPINA1</i>	2.2
	31	ARP3 - Proteína relacionada a actina 3	P61158	<i>ACTR3</i>	3.6
	32	IF4A1 - Fator eucariótico de iniciação 4A-I	P60842	<i>EIF4A1</i>	3.1
		HNRPF - Ribonucleoproteína nuclear heterogênea F	P52597	<i>HNRNPF</i>	
	33*	VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	2.3
	34	CAPG - Proteína <i>macrophage-capping</i>	P40121	<i>CAPG</i>	7.1
	35	CAPG - Proteína <i>macrophage-capping</i>	P40121	<i>CAPG</i>	8.1
	36*	HPT - Haptoglobina	P00738	<i>HP</i>	2.4
	37	VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	3.2
	38	PDIA3 - Proteína dissulfeto isomerase A3	P30101	<i>PDIA3</i>	2.1
	39	WDR61 - Proteína <i>WD repeat-containing</i>	Q9GZS3	<i>WDR61</i>	3.1
	40	PSME2 - Complexo ativador do proteassoma subunidade 2	Q9UL46	<i>PSME2</i>	3.2
	41	CASPE - Caspase-14	P31944	<i>CASP14</i>	36.5
	42	1433Z - Proteína 14-3-3 epsilon	P63104	<i>YWHAZ</i>	2.8
43	HSPB1 - Proteína <i>heat shock</i> beta-1	P04792	<i>HSPB1</i>	6.1	

NOTA: \*proteína mais expressa no tecido mamário não tumoral.

TABELA 9: Continuação.

Amostra	Banda	Proteína	Código Swiss-prot	Gene (UniGene)	Fold change
Somente em CP622	44*	TRFE - Sorotransferrina	P02787	TF	2.2
	45	AMPL - Aminopeptidase citosólica	P28838	LAP3	3.0
	46	SBP1 - Proteína ligante de selênio 1	Q1M2P6	SELENBP1	3.7
	47	SBP1 - Proteína ligante de selênio 1	Q1M2P6	SELENBP1	5.2
	48*	SEPT2 - Septina-2	Q15019	SEPT2	3.7
	49	AK1A1 - Álcool desidrogenase [NADP(+)]	P14550	AKR1A1	2.1
	50*	VIME - Vimentina	P08670	VIM	2.1
	51	ABHEB - Proteína contend domínio alfa/beta hidrolase 14B	Q96IU4	ABHD14B	2.4
	52*	APT - Adenina Fosforibosiltransferase	P07741	APRT	5.8
Somente em CP633	53*	ANXA6 - Anexina A6	P08133	ANXA6	2.9
		ALBU - Albumina sérica	P02768	ALBU	
	54	STIP1 - Proteína induzida por estresse 1	P31948	STIP1	3.4
	55	CH60 - Proteína <i>heat shock</i> 60 kDa, mitocondrial	P10809	HSPD1	3.8
	56	PDIA3 - Proteína dissulfeto isomerase A3	P30101	PDIA3	6.9
	57	K2C7 - Queratina, tipo II do citoesqueleto 7	P08729	KRT7	13.0
	58	ACTB/G - Actina, citoplasmática 1 / 2	P60709/P63261	ACTB/ACTG	14.4
		TYPH - Timidina fosforilase	P19971	TYMP	
	59	AMPL - Aminopeptidase citosólica	P28838	LAP3	2.2
	60	A1AT - Alfa-1-antitripsina	P01009	SERPINA1	2.4
	61	FIBG - Fibrinogênio cadeia gama	P02679	FGG	2.1
	62	ENOA - Alfa-enolase	P06733	ENO1	5.0
	63	GDIB - Inibidor de dissociação Rab GDP beta	P50395	GDI2	2.8
	64	EFTU - Fator de alongamento Tu, mitocondrial	P49411	TUFM	2.9
	65	BPNT1 - 3'(2'),5'-bisfosfato nucleotidase 1	O95861	BPNT1	3.5
	66	STRAP- Proteína associada ao receptor serina-treonina quinase	Q9Y3F4	STRAP	3.3
	67	TBB5 - Tubulina cadeia beta	P07437	TUBB	2.6
	68	PGPS1 - CDP-diacilglicerol--glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferase, mitocondrial	Q32NB8	PGS1	6.9
	69*	SNAA - Proteína <i>alpha-soluble NSF attachment</i>	P54920	NAPA	2.7
	70	CAZA1 - Proteína <i>F-actin-capping</i> subunidade alfa-1	P52907	CAPZA1	3.3
	71	SNAA - Proteína <i>alpha-soluble NSF attachment</i>	P54920	NAPA	4.4
	72	ANXA3 - Anexina A3	P12429	ANXA3	6.0
	73	ANXA4 - Anexina A4	P09525	ANXA4	3.9
	74	ECH1 - Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA isomerase, mitocondrial	Q13011	ECH1	3.1
	75	CLIC1 - Proteína canal de cloreto intracelular 1	O00299	CLIC1	5.6
	76	CATB - Catepsina B	P07858	CTSB	2.4
	77	CAPZB - Proteína <i>F-actin-capping</i> subunidade beta	P47756	CAPZB	4.0
	78	PNPH - Purina nucleosídeo fosforilase	P00491	PNP	2.6
	79	CASPE - Caspase-14	P31944	CASP14	6.6
	80	ACTB/G - Actina, citoplasmática 1 / 2	P60709/P63261	ACTB/ACTG	7.1
	81	PRDX4 - Peroxirredoxina-4	Q13162	PRDX4	5.5
	82*	GSTP1 - Glutathione S-transferase P	P09211	GSTP1	3.5
		HNRPF - Ribonucleoproteína nuclear heterogênea F	P52597	HNRNPF	
	83	GSTP1 - Glutathione S-transferase P	P09211	GSTP1	2.2
	84*	PRDX2 - Peroxirredoxina-2	P32119	PRDX2	2.7
	85	APT - Adenina fosforibosiltransferase	P07741	APRT	3.1
	86	NDKA - Nucleosídeo difosfato quinase A	P15531	NME1	9.2
	87	ARPC5 - Complexo proteína 2/3 relacionado a actina subunidade 5	O15511	ARPC5	2.3
	88	ACTB/G - Actina, citoplasmática 1 / 2	P60709/P63261	ACTB/ACTG	5.2
89	COX5A - Citocromo c oxidase subunidade 5A, mitocondrial	P20674	COX5A	2.3	

NOTA: \*proteína mais expressa no tecido mamário não tumoral.



TABELA 9: Continuação.

Amostra	Banda	Proteína	Código Swiss-prot	Gene (UniGene)	Fold change
Somente em CP645	90	GDIA - Inibidor de dissociação Rab GDP alfa	P31150	<i>GDI1</i>	2.3
	91	VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	3.9
		FIBG - Fibrinogênio cadeia gama	P02679	<i>FGG</i>	
	92	K2C8 - Queratina, type II do citoesqueleto 8	P05787	<i>KRT8</i>	5.3
	93	A1AT - Alfa-1-antitripsina	P01009	<i>SERPINA1</i>	2.9
		VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	
	94	A1AT - Alfa-1-antitripsina	P01009	<i>SERPINA1</i>	4.3
		VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	
	95	VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	2.2
	96	ACL6A - Proteína <i>actin-like</i> 6A	O96019	<i>ACTL6A</i>	3.0
	97	NDRG1 - Proteína NDRG1	Q92597	<i>NDRG1</i>	7.4
	98*	VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	4.6
	99	NDRG1 - Proteína NDRG1	Q92597	<i>NDRG1</i>	2.3
	100	H6ST1 - Heparan-sulfato 6-O-sulfotransferase 1	O60243	<i>HS6ST1</i>	2.2
		NPM - Nucleofosmina	P06748	<i>NPM1</i>	
	101	NPM - Nucleofosmina	P06748	<i>NPM1</i>	13.4
	102	TPM4 - Tropomiosina cadeia alfa-4	P67936	<i>TPM4</i>	6.8
103	TPM1 - Tropomiosina cadeia alfa-1	P09493	<i>TPM1</i>	4.4	
104	1433T - Proteína 14-3-3 theta	P27348	<i>YWHAQ</i>	2.3	
105*	LAC2 - <i>Ig lambda-2 chain C regions</i>	P0CG05	<i>IGLC2</i>	2.3	
	IGKC - <i>Ig kappa chain C region</i>	P01834	<i>IGKC</i>		
106	PSD10 - 26S proteassoma <i>non-ATPase regulatory</i> subunidade 10	O75832	<i>PSMD10</i>	2.8	
107	GGCT - glutamilciclotransferase gama	O75223	<i>GGCT</i>	2.0	
Somente em CP655	108	CH60 - Proteína <i>heat shock</i> 60 kDa, mitocondrial	P10809	<i>HSPD1</i>	2.5
	109*	TBA1C - Tubulina cadeia alfa-1C /	Q9BQE3 /	<i>TUBA1C /</i>	3.5
		TBA1B - Tubulina cadeia alfa-1B /	P68363 /	<i>TUBA1B /</i>	
		TBA1A - Tubulina cadeia alfa-1A	Q71U36	<i>TUBA1C</i>	
	110	VATB2 - <i>V-type proton ATPase subunit B</i> , isoforma cerebral	P21281	<i>ATP6V1B2</i>	4.0
	111	K1C9 - Queratina, tipo I do citoesqueleto 9	P35527	<i>KRT9</i>	3.5
	112	TBB5 - Tubulina cadeia beta	P07437	<i>TUBB</i>	3.6
	113	ACTB/G - Actina, citoplasmática 1 / 2	P60709/P63261	<i>ACTB/ACTG</i>	4.1
	114	RSSA - Proteína 40S ribossomal AS	P08865	<i>RPSA</i>	2.2
	115	ERLN2 - Erlin-2	O94905	<i>ERLIN2</i>	3.8
	116	EIF3I - Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade I	Q13347	<i>EIF3I</i>	5.4
	117	VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	3.8
	118	TBB5 - Tubulina cadeia beta	P07437	<i>TBB</i>	3.8
	119	K1C19 - Queratina, tipo I do citoesqueleto 19	P08727	<i>KRT19</i>	5.4
		VIME - Vimentina	P08670	<i>VIM</i>	
	120	EIF3I - Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade I	Q13347	<i>EIF3I</i>	2.1
	121	ACTB/G - Actina, citoplasmática 1 / 2	P60709/P63261	<i>ACTB/ACTG</i>	3.5
	122	CAZA2 - Proteína <i>F-actin-capping</i> subunidade alfa-2	P47755	<i>CAPZA2</i>	3.7
	123	ANXA4 - Anexina 4	P09525	<i>ANXA4</i>	2.5
	124	CATD - Catepsina D	P07339	<i>CTSD</i>	4.4
	125	RSSA - Proteína 40S ribossomal AS	P08865	<i>RPSA</i>	6.8
	126	IMPA1 - Inositol monofosfatase 1	P29218	<i>IMPA1</i>	4.0
	127	PGAM1 - Fosfoglicerato mutase 1	P18669	<i>PGAM1</i>	2.9
	128	PHB - Proibitina	P35232	<i>PHB</i>	3.1
	129	PRDX4 - Peroxirredoxina-4	Q13162	<i>PRDX4</i>	5.7
	130	GSTM3 - Glutathione S-transferase Mu 3	P21266	<i>GSTM3</i>	4.4
	131	K2C8 - Queratina, tipo II do citoesqueleto 8	P05787	<i>KRT8</i>	2.2
132	PRDX2 - Peroxirredoxina-2	P32119	<i>PRDX2</i>	5.1	
133*	HPTR - Proteína <i>haptoglobina-related</i>	P00739	<i>HPR</i>	8.1	

NOTA: \*proteína mais expressa no tecido mamário não tumoral.

**TABELA 9** (Continuação).

Amostra	Banda	Proteína	Código Swiss-prot	Gene (UniGene)	Fold change
	134*	A1BG - Glicoproteína alfa-1B	P04217	<i>A1BG</i>	3.3
	135*	K1C14 - Queratina, tipo I do citoesqueleto 14	P02533	<i>KRT14</i>	2.3
	136*	FETUA - Glicoproteína alfa 2-HS	P02765	<i>AHSG</i>	3.2
	137*	FETUA - Glicoproteína alfa 2-HS	P02765	<i>AHSG</i>	3.7
	138*	FETUA - Glicoproteína alfa 2-HS	P02765	<i>AHSG</i>	2.2
	139*	ALBU - Albumina sérica	P02768	<i>ALBU</i>	2.7
		APOH - Glicoproteína 1 beta-2	P02749	<i>APOH</i>	
	140*	ALBU - Albumina sérica	P02768	<i>ALBU</i>	5.9
		FIBB - Fibrinogênio cadeia beta	P02675	<i>FGB</i>	
	141*	ALBU - Albumina sérica	P02768	<i>ALBU</i>	5.8
		LMNA - Prelamina-A/C	P02545	<i>LMNA</i>	
	142	RSSA - Proteína 40S ribossomal AS	P08865	<i>RPSA</i>	6.9
	143*	ZN224 - Proteína <i>zinc finger</i> 224	Q9NZL3	<i>ZNF224</i>	2.0
	144	K1C19 - Queratina, tipo I do citoesqueleto 19	P08727	<i>KRT19</i>	2.7
	145	K2C8 - Queratina, tipo II do citoesqueleto 8	P05787	<i>KRT8</i>	10.0
	146	K1C19 - Queratina, tipo I do citoesqueleto 19	P08727	<i>KRT19</i>	2.6
	147	K2C8 - Queratina, tipo II do citoesqueleto 8	P05787	<i>KRT8</i>	2.2
	148	TBB5 - Tubulina cadeia beta	P07437	<i>TUBB</i>	2.4
	149	GLOD4 - Proteína com domínio glicoxalase 4	Q9HC38	<i>GLOD4</i>	2.4
	150	CLIC1 - Chloride intracellular channel protein 1	O00299	<i>CLIC1</i>	2.4
	151	CATD - Catepsina D	P07339	<i>CTSD</i>	2.2
	152	PRDX4 - Peroxirredoxina-4	Q13162	<i>PRDX4</i>	2.0
	153*	GSTM2 - Glutathione S-transferase Mu 2	P28161	<i>GSTM2</i>	2.1
	154	COMT - Catechol O-methyltransferase	P21964	<i>COMT</i>	4.1
	155*	APOA1 - Apolipoproteína A-I	P02647	<i>APOA1</i>	2.9
	156*	APOA1 - Apolipoproteína A-I	P02647	<i>APOA1</i>	2.2
	157	LGUL - Lactoilglutaciona liase	Q04760	<i>GLO1</i>	2.6
	158	K2C1 - Queratina, tipo II do citoesqueleto 1	P04264	<i>KRT1</i>	2.6
	159	NDKA - Nucleosídeo difosfato quinase A	P15531	<i>NME1</i>	2.2
	160*	HPT - Haptoglobina	P00738	<i>HP</i>	2.0
	161*	A1AT - Alfa-1-antitripsina	P01009	<i>SERPINA1</i>	4.6

Somente em CP672

NOTA: \*proteína mais expressa no tecido mamário não tumoral.

FONTE: O autor (2015)

A Tabela 10 mostra as 10 proteínas com maior variação de expressão entre aquelas encontradas em ao menos duas amostras (CAPG aparece duas vezes), a regulação da expressão no tumor em relação ao tecido saudável, o número de amostras em que foram identificadas e a classe funcional de cada uma.

**TABELA 10:** Dez proteínas com maior variação de expressão de acordo com o tecido tumoral, presentes em ao menos duas amostras.

Banda	Proteína	Varição média de expressão	Amostras (n)	Classificação funcional
41	CASPE - Caspase-14	26,1 ↑	2	Regulação de proliferação e crescimento celular
18	ENOG - Enolase gama	11,6 ↑	3	Enzima metabólica
12	TPM1 - Tropomiosina cadeia alfa-1	8,9 ↑	4	Citoesqueleto e proteínas associadas
34	CAPG Proteína <i>macrophage-capping</i>	8,8 ↑	2	Citoesqueleto e proteínas associadas
37	VIME - Vimentina	8,45 ↑	2	Citoesqueleto e proteínas associadas
7	TPM3 - Tropomiosina cadeia alfa-3	6,8 ↑	5	Citoesqueleto e proteínas associadas
1	TRFE - Sorotransferrina	5,9 ↓	5	Função de ligação
35	CAPG - Proteína <i>macrophage-capping</i>	5,5 ↑	2	Citoesqueleto e proteínas associadas
10	PDIA6 - Proteína dissulfeto-isomerase A6	5,2 ↑	4	chaperona molecular / HSP
39	WDR61 - Proteína 61 com repetição WD	5,05 ↑	2	Outras funções
17	PDIA3 - Proteína dissulfeto-isomerase A3	4,8 ↑	3	chaperona molecular / HSP

NOTA: ↑ - expressão aumentada no tecido tumoral; ↓ - expressão diminuída no tecido tumoral; HSP - *Heat shock protein*.

FONTE: O autor (2015).

A Tabela 11 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com informações da literatura, levando em conta as principais proteínas abordadas.

**TABELA 11:** Comparação dos resultados obtidos pela análise proteômica de expressão diferencial e trabalhos disponíveis na literatura para as proteínas comuns a no mínimo duas amostras.

Código da proteína*	Expressão observada	Expressão na literatura	Referência
<i>Dados conflitantes entre a expressão observada e a relatada na literatura</i>			
TRFE	Reduzida	Aumentada	Pucci-Minafra <i>et al.</i> , 2007; FAULK <i>et al.</i> , 1980.
FIBB	Aumentada	Reduzida	Somiari <i>et al.</i> , 2003; Mosesson, 2005.
IPYR	Aumentada	Sem alteração	Jeong <i>et al.</i> , 2012; Lexander <i>et al.</i> , 2005; Selicharová <i>et al.</i> , 2007.
TPM1,3,4	Aumentada	Reduzida	Pucci-Minafra <i>et al.</i> , 2007; Carvalho, 2013; Bhattacharya <i>et al.</i> , 1990; Franzén <i>et al.</i> , 1996; Kabbage <i>et al.</i> , 2013.
ATPB	Aumentada	Conflitante	Selicharová <i>et al.</i> , 2007; Alldridge <i>et al.</i> , 2008; Huang <i>et al.</i> , 2008; Sutton <i>et al.</i> , 2010.
A1AT	Aumentada	Reduzida	López-Árias <i>et al.</i> , 2012, Somiari <i>et al.</i> , 2003; Deng <i>et al.</i> , 2006.
HPT	Aumentada	Reduzida	Pucci-Minafra <i>et al.</i> , 2007; Somiari <i>et al.</i> , 2003.
HNRPF	Aumentada	Conflitante	Balasubramani <i>et al.</i> , 2006.

TABELA 11: Continuação.

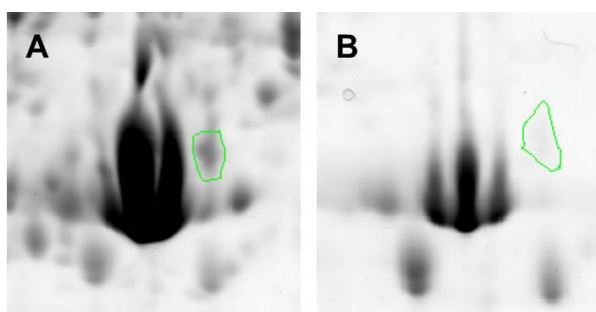
Código da proteína*	Expressão observada	Expressão na literatura	Referência
<i>Dados conflitantes entre a expressão observada e a relatada na literatura</i>			
PSA3,5	Aumentada	Dados insuficientes	Murata <i>et al.</i> , 2009.
WDR61	Aumentada	Dados insuficientes	-
IF4A1	Aumentada	Dados insuficientes	Stoneley & Willis, 2015; Modelska <i>et al.</i> , 2005.
QCR1	Aumentada	Dados insuficientes	Khan <i>et al.</i> , 2013.
TCPE	Aumentada	Dados insuficientes	Shim <i>et al.</i> , 2015.
<i>Expressão observada corroborando informações disponíveis na literatura</i>			
PSME1,2	Aumentada	Aumentada	Somiari <i>et al.</i> , 2003; Sutton <i>et al.</i> , 2010; Ebert <i>et al.</i> , 2005; Perroud <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2010.
GDIR1,2	Aumentada	Aumentada	Pucci-Minafra <i>et al.</i> , 2007; Wulfkuhle <i>et al.</i> , 2002; Kang <i>et al.</i> , 2010; Fritz <i>et al.</i> , 2002; Moon <i>et al.</i> , 2010.
PDIA3,6	Aumentada	Aumentada	Alldrige <i>et al.</i> , 2008; Ramos <i>et al.</i> , 2015; Song <i>et al.</i> , 2012.
CALR	Aumentada	Aumentada	Song <i>et al.</i> , 2012a; Kabbage <i>et al.</i> , 2013.
1433G,Z,T,E	Aumentada	Aumentada	Alldrige <i>et al.</i> , 2008; Wulfkuhle <i>et al.</i> , 2002; Song <i>et al.</i> , 2012b; Li <i>et al.</i> , 2014.
PLSL	Aumentada	Aumentada	Alldrige <i>et al.</i> , 2008; Lapillonne <i>et al.</i> , 2000.
HSPB1	Aumentada	Aumentada	Carcoforo <i>et al.</i> , 2013; Hudelist <i>et al.</i> , 2006; Grzegorzolka <i>et al.</i> , 2012.
PRDX3	Aumentada	Aumentada	Noh <i>et al.</i> , 2001; Karihtala <i>et al.</i> , 2003; Chua <i>et al.</i> , 2010.
TBA1B	Aumentada	Aumentada	Niu <i>et al.</i> , 2009.
VIME	Aumentada	Aumentada	Pucci-Minafra <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2015; Satelli & Li, 2011; Milioli <i>et al.</i> , 2015.
CASPE	Aumentada	Aumentada	Selicharová <i>et al.</i> , 2007; Krajewska <i>et al.</i> , 2005; Helfman <i>et al.</i> , 2008; Asselin-Labat <i>et al.</i> , 2011.
ARP3	Aumentada	Aumentada	Wulfkuhle <i>et al.</i> , 2002; Giri <i>et al.</i> , 2013.
PARK7	Aumentada	Aumentada	Le Naour <i>et al.</i> , 2001; Ismail <i>et al.</i> , 2014.
ENOG	Aumentada	Aumentada	Matsushima <i>et al.</i> , 1994; Nesland <i>et al.</i> , 1986; Kirillina <i>et al.</i> , 2015.
CAPG	Aumentada	Aumentada	Kang <i>et al.</i> , 2010; Renz <i>et al.</i> , 2008.
SEC13	Aumentada	Aumentada	Liang <i>et al.</i> , 2010.

FONTE: O autor (2015).

Observamos que 12 bandas foram identificadas como mistura de duas proteínas, são elas: 32, 53, 58, 82, 91, 93, 94, 105, 119, 139, 140 e 141. Isso ocorre quando há peptídeos exclusivos de cada proteína.

Tomando como exemplo a banda 32 (FIGURA 9), onde as duas proteínas (IF4A1 / HNRPF) possuem valores de MM e pI próximos e a faixa de pH utilizada neste trabalho não foi suficiente para separá-las. Mas olhando cuidadosamente na

imagem do gel de tumor, é possível distinguir duas bandas, mas não é possível definir os limites de cada uma. Com isso, o programa de análise considerou como banda única. Mesmo proteínas com valores de MM ou pI teóricos não tão próximos podem ser identificadas juntas, pois PTMs podem alterar e aproximar esses valores. Outra situação que pode ser demonstrada neste exemplo é que há casos em que a banda em um dos géis apresenta uma marcação muito fraca (pouca quantidade de proteína) e não permite confirmar no gel de um tecido a identificação obtida a partir do gel do outro.



**FIGURA 9: Destaque da banda 32 no gel da amostra CP 645. (A) Tecido tumoral e (B) não tumoral.**

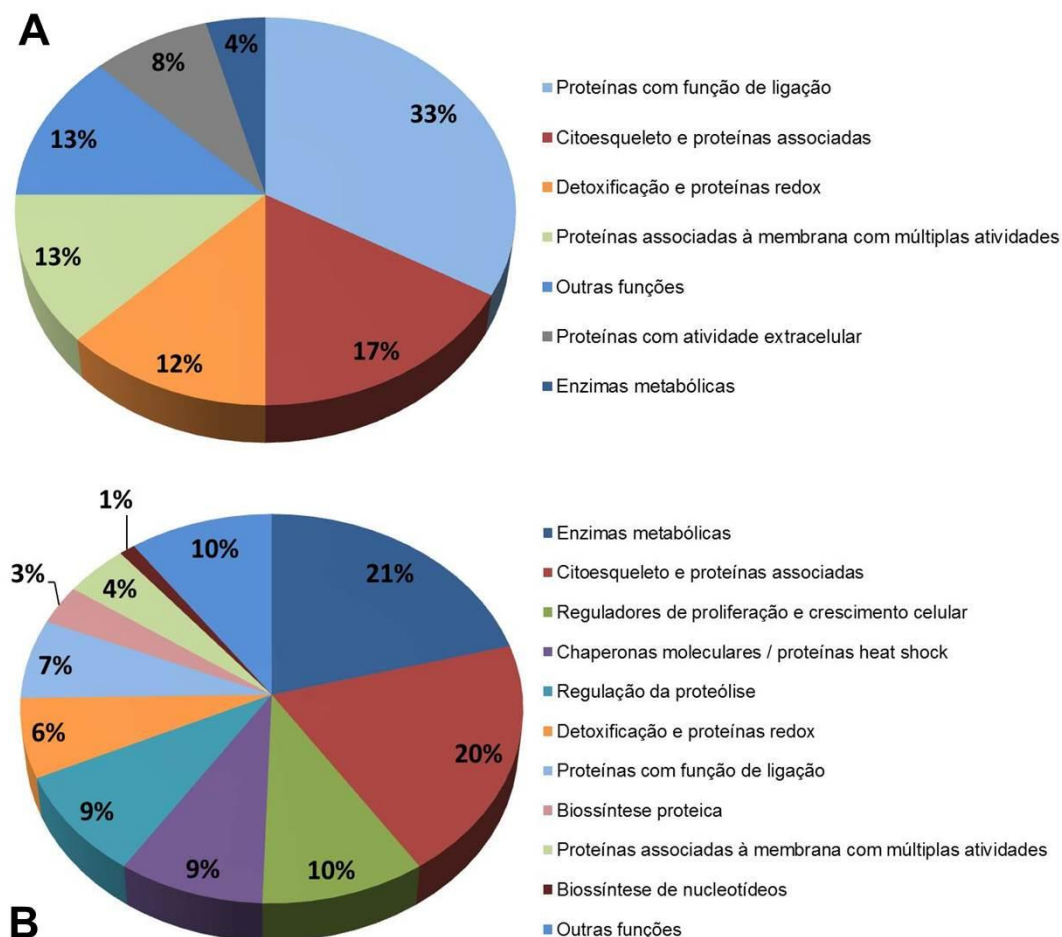
Nas bandas 53, 139, 140 e 141, observamos a albumina (ALBU) em mistura com outra proteína. ALBU é uma proteína abundante no soro e considerada contaminante quando identificada em análises proteômicas. Sempre é observada em maior quantidade na amostra não tumoral em relação à tumoral, por ser difícil fazer a separação dos tecidos glandular, adiposo e vascular. A expressão aumentada destas quatro bandas no tecido não tumoral, provavelmente ocorreu apenas pela contaminação com albumina. A eterna discussão sobre remover ou não a albumina da amostra se aplica aqui. Se por um lado a depleção poderia melhorar a resolução dos géis e expor proteínas escondidas pelas grandes bandas de albumina, por outro ela poderia também remover proteínas que são carregadas pela albumina. Logo, as duas opções apresentam seus prós e contras. Neste trabalho optamos por não proceder à depleção de ALBU.

Nas bandas 105 (LAC2/IGKC), 23 (1433 E/Z), 109 (TBA1 A/B/C) e 58, 80, 88, 113, 121 (todas ACT B/G), apesar de não consideradas como mistura, mais de uma proteína obteve *score* de  $p > 0,05$ . É comum que membros de famílias conservadas evolutivamente sejam identificados na mesma banda por PMF, pois,

por exemplo, ACTB e ACTG diferem em apenas quatro aminoácidos e isso faz com que a maioria dos peptídeos gerados para estas proteínas sejam idênticos.

### Classes funcionais

As proteínas identificadas foram separadas de acordo com suas principais funções biológicas em 12 classes (FIGURA 10), segundo Pucci-Minafra (2006; 2007): (1)Citoesqueleto e proteínas associadas; (2)Enzimas metabólicas; (3)Chaperonas moleculares / proteínas *heat shock*; (4)Regulação da proteólise; (5)Detoxificação e proteínas redox; (6)Reguladores de crescimento e proliferação celular; (7)Proteínas com função de ligação; (8)Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades; (9)Proteínas com atividade extracelular; (10)Biossíntese proteica; (11)Biossíntese de nucleotídeos; (12)Outras funções.



**FIGURA 10: Distribuição em classes funcionais das proteínas identificadas.** (A) Proteínas mais expressas no tecido não tumoral e no (B) tecido tumoral.

FONTE: O autor (2015)

## 6.2. Análise de expressão do gene *STIP1* por RT-qPCR

A TABELA 12 mostra as médias de quantificação relativa (QR) do RNAm de *STIP1* do tecido tumoral e do linfonodo metastático em relação ao controle não tumoral, além da análise de diversos parâmetros utilizados na prática médica como fatores de prognóstico (idade, *status* “presença ou ausência” dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, tipo histológico e grau tumoral).

**TABELA 12:** Média da quantificação relativa (QR) de *STIP1* em tumor e linfonodo metastático, de acordo com os parâmetros analisados.

Parâmetro	Grupo	QR Média ± Desvio padrão	Teste <i>t</i>	Significância
Tumor x Linfonodo	Total da amostra tumoral	3,77 ± 5,19	$t'=2,89 > t_c=2,076$	<b>p&lt;0,05</b>
	Linfonodo metastático	1,45 ± 1,03		
Tipo histológico do tumor	<i>CDI</i>	3,76 ± 4,44	A - $t'=1,81 < t_c=2,21$ B - $t'=1,03 < t_c=2,32$	p>0,05
	<i>CLI</i>	2,17 ± 0,96		
	<i>Outros</i>	5,03 ± 8,70		
<i>Status</i> receptor	Triplo Negativo	5,14 ± 4,56	$t=0,62$	p>0,05
	RH+, HER2-	3,89 ± 4,52		
<i>Status</i> linfonodo (Total da amostra tumoral)	com metástase	4,08 ± 5,06	$t=0,19$	p>0,05
	sem metástase	3,77 ± 5,67		
<i>Status</i> linfonodo (CDI)	com metástase	4,64 ± 5,72	$t=1,04$	p>0,05
	sem metástase	3,09 ± 3,58		
Idade (Total da amostra tumoral)	< 50 anos	2,95 ± 2,88	$t'=1,29 < t_c=2,07$	p>0,05
	≥ 50 anos	4,89 ± 6,90		
Idade (CDI)	< 50 anos	3,01 ± 2,99	$t'=1,10 < t_c=2,11$	p>0,05
	≥ 50 anos	4,67 ± 5,72		
Grau (Total da amostra tumoral)	I - II	3,38 ± 4,01	$t=0,26$	p>0,05
	III	2,98 ± 4,86		
Grau (CDI)	I - II	3,85 ± 4,52	$t=0,51$	p>0,05
	III	2,98 ± 4,86		

NOTA: A: análise entre CDI x CLI; B: análise entre CLI x Outros.

FONTE: O autor (2015).

A média da expressão do RNAm de *STIP1* foi significativamente maior no tecido tumoral do que a do linfonodo metastático ( $t'=2,89 > t_c=2,076$ ). Não houve diferença significativa entre as médias em função do grau e *status* dos receptores

dos tumores, bem como em função da faixa etária e presença ou ausência de metástases em linfonodos das pacientes (TABELA 12). Aplicando o teste de Bartlett aos dados de “Tipo histológico do tumor” obteve-se um valor de  $\chi^2_2(\text{corr.})=16,11$  ( $p<0,001$ ) que demonstra que as variâncias das três amostras analisadas não são homogêneas, inviabilizando a utilização de ANOVA para avaliar as diferenças entre as médias. Assim, utilizamos o teste  $t$  para realizar duas das comparações possíveis entre as três médias amostrais. Comparamos a significância das diferenças entre as médias de A) “CDI x CLI” e B) “CLI x Outros” por apresentarem as maiores diferenças, sendo que para nenhuma das duas comparações o resultado foi estatisticamente significativo (TABELA 12). Baseado nestes resultados pode-se supor que a diferença entre as médias dos grupos “CDI” e “Outros” também não é estatisticamente significativa, pois a diferença entre as mesmas é menor do que entre as anteriores.

A Tabela 13 apresenta os dados de oito amostras pareadas de tumores e linfonodos (isto é, obtidos da mesma paciente).

**TABELA 13:** Valores da quantificação relativa (QR) obtidos de oito amostras pareadas de tumor e linfonodo metastático.

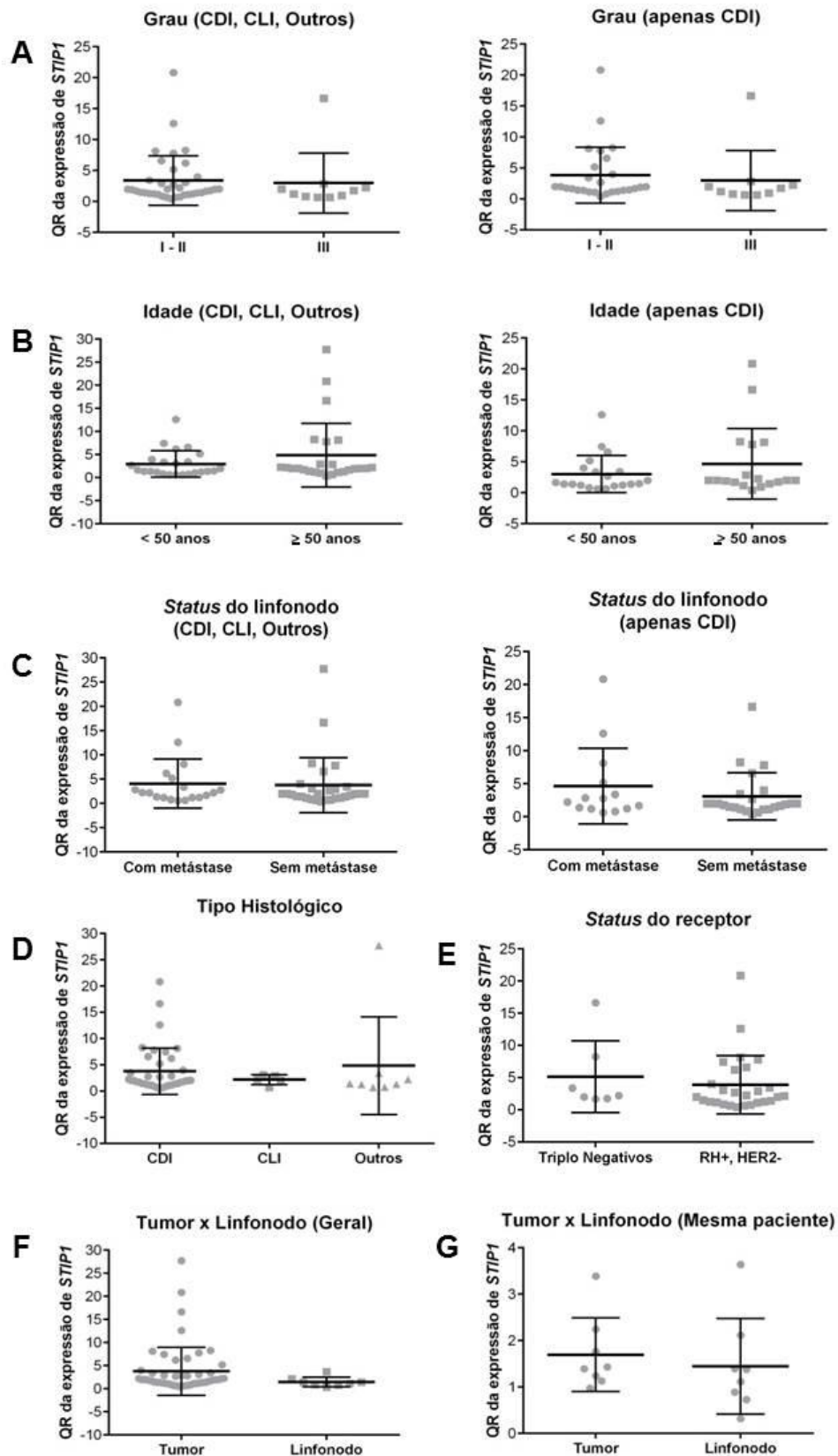
Amostra	QR Tumor	QR Linfonodo	Desvio (d)
CP 805	0,971	0,727	0,244
CP 806	1,392	1,381	0,011
CP 818	1,133	0,320	0,813
CP 825	3,389	0,888	2,501
CP 837	1,764	1,394	0,370
CP 840	2,244	3,638	-1,394
CP 843	1,242	1,115	0,127
CP 865	1,432	2,115	-0,683

FONTE: O autor (2015).

A média obtida foi igual a  $\bar{d}=0,249\pm 0,40$  e o teste  $t$  para os dados emparelhados indicou que há diferença significativa no nível de 1% ( $t=4,97$ ;  $p<0,01$ ).

A Figura 11 mostra os gráficos de dispersão das médias para todos os parâmetros avaliados.



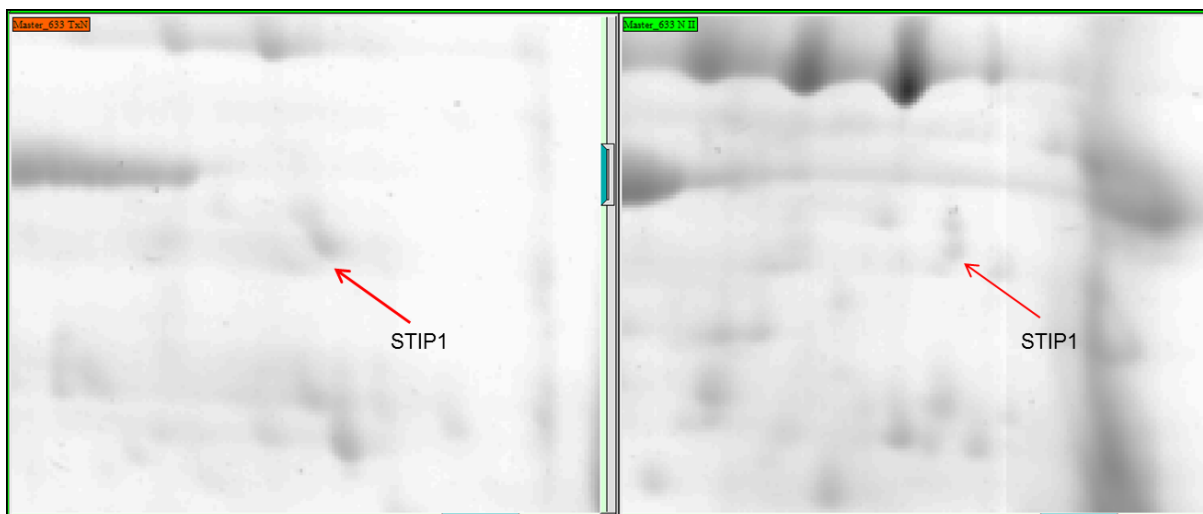


**FIGURA 11: Gráficos de dispersão das médias de expressão de *STIP1* para os parâmetros avaliados.** (A)Grau; (B)Idade; (C)*Status* do linfonodo: presença ou ausência de metástase em linfonodo; (D)Tipo histológico; (E)*Status* dos receptores; (F)Total da amostra de tumor x Linfonodos metastáticos; e (G)Amostras de tumor e linfonodo pareadas.

FONTE: O autor (2015).

### 6.3. Análise de expressão de STIP1 por *Western Blotting*

A proteína STIP1, expressa 3,4 vezes mais no tecido tumoral da amostra CP 633 (FIGURA 12), foi escolhida para as demais análises.

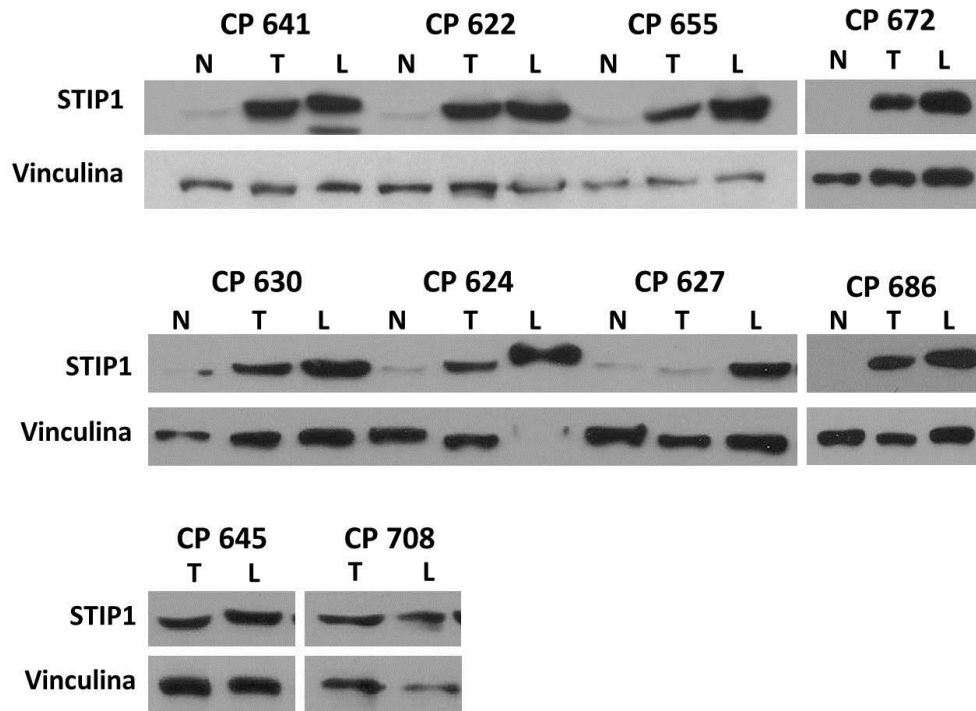


**Figura 12: Localização da proteína STIP1 no gel da amostra CP 633.** Massa molecular teórica 63,2 kDa e observada 65 kDa. ponto isoelétrico teórico 6,4 e observado 6,76. Expressão 3,4 vezes aumentada no tecido tumoral (esquerda) em relação ao não tumoral (direita).

A Figura 13 mostra os resultados da análise por *Western Blotting* realizada tendo a vinculina como normalizador e comparando os diversos tecidos, conforme descrito em Material e Métodos.

Para a avaliação simultânea da significância das diferenças das três médias amostrais, é recomendada a análise da variância ANOVA, cuja condição é que a variância das três amostras seja homogênea. Para tal, aplicou-se o teste de Bartlett e verificou-se que as variâncias não eram homogêneas.  $\chi^2_2(\text{corr.})=37,255$ ;  $p<0,001$ . Assim, duas das três comparações entre as médias foram feitas através do teste *t*.

Na comparação T x N, a diferença entre as médias foi significativa com  $F=97,85$  (significante a 0,025) e  $t=3,33$ ,  $p<0,05$ . Baseados neste resultado e considerando a diferença entre as médias e os valores das variâncias, pode-se admitir que a diferença entre as médias de N x L também seja estatisticamente significativa. A amostra de linfonodo CP 624 não foi considerada na análise estatística devido à má qualidade das bandas de vinculina desta duplicata, o que inviabilizou a normalização.



**Figura 13: Western blotting da proteína alvo STIP1 e da proteína normalizadora vinculina.** (N) Tecido não tumoral, (T) tumoral e de (L) linfonodo.

FONTE: O autor (2015).

Na comparação entre as médias de T x L, o valor de  $F=12,28$  foi significativo a 0,025. O valor do teste  $t$  não foi estatisticamente significativo:  $t'=1,473 < t_c=2,303$ .

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Análise proteômica comparativa

#### *Proteínas identificadas em ao menos duas amostras*

Observamos que de todas as bandas inicialmente visualizadas, apenas 43 apresentavam expressão diferencial na amostra referência (CP 645) e em mais uma entre as outras quatro amostras. Isto era esperado devido à grande heterogeneidade do câncer de mama e à utilização de uma classificação histológica ampla (CDI), desconsiderando os marcadores imunohistoquímicos ER, PR, HER2, Ki-67 e outros para subclassificação. Além disso, há a individualidade de cada paciente que contribui para a complexidade do tecido e isto também é evidenciado pela quantidade de bandas detectadas pelo programa de análise, onde não apenas a variação entre os dois tecidos, mas também entre amostras do mesmo tecido é bastante evidente.

Após esta observação, procuramos obter um grupo principal de acordo com a diferença de expressão e, a seguir, as dez proteínas com maior variação de expressão (TABELA 10) serão discutidas, focando em suas funções nas células e no câncer de mama, assim como nos respectivos potenciais como biomarcadores de diagnóstico quando comparadas com o tecido não tumoral.

Com função celular diferente das demais proteínas da família das caspases, a caspase-14 (CASPE) é uma caspase não apoptótica envolvida na diferenciação epitelial e tem alta expressão em tecidos embrionários. Em um estudo de 2005, a expressão aumentada de CASPE mostrou associação com tumores de alto grau e parece ser uma alteração que ocorre nas etapas iniciais da patogênese do câncer de mama (KRAJEWSKA *et al.*, 2005). A expressão elevada de CASPE também foi observada em outros estudos em câncer de mama (SELICHAROVÁ *et al.*, 2007; HELFMAN *et al.*, 2008). Neste estudo, esta proteína foi a de maior expressão diferencial, mostrando-se cerca de 26 vezes mais expressa no tecido tumoral, corroborando os resultados destes autores. Por outro lado, Asselin-Labat e

colaboradores (2011) descreveram um resultado *in vitro* discordante. Estes autores identificaram o gene *CASP14* como provável alvo transcricional de *GATA-3* e que o aumento da expressão de *CASPE* em linhagem celular de câncer de mama atrasa significativamente o crescimento tumoral, mesmo efeito do aumento da expressão de *GATA3*.

As moléculas de enolase são dímeros que podem ser formados por três subunidades diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Quando utilizada na caracterização e diagnóstico de câncer, os dímeros  $\gamma\gamma$  e  $\alpha\gamma$  são chamados de “enolase neurônio-específica” e sua alta expressão tem sido descrita como característica de tumor de mama neuroendócrino. Diversos estudos de imunocoloração relataram a alta proporção de células marcadas para enolase- $\gamma$  (ENOG) em carcinomas mamários, enquanto nenhum sinal foi observado em tecido não tumoral (KIRILLINA *et al.*, 2015; MATSUSHIMA *et al.*, 1994; NESLAND *et al.*, 1986). Nossos resultados estão de acordo com estes autores desde que descrevemos um aumento de expressão de quase 12 vezes no tecido tumoral e, de grande interesse, ampliamos o subgrupo de tumores mamários onde a alta expressão de ENOG pode estar presente, desde que a expressão aumentada foi detectada no tecido tumoral de três pacientes com CDI, sem características de carcinoma neuroendócrino.

CAPG (*macrophage capping protein*) é uma proteína de ligação à actina relacionada à família das Gelsolinas, que são proteínas ligantes de actina, que desempenha um papel regulador na agregação e desagregação dos filamentos de actina. A CAPG está localizada intracelularmente (no citosol e na mitocôndria) e extracelularmente (no plasma). Quando presente no citoplasma está envolvida no controle de motilidade celular e fagocitose (WITKE *et al.*, 2001; SILACCI *et al.*, 2004). Sua função no núcleo ainda é desconhecida, mas é o único membro da família que se acumula nessa região (RENZ *et al.*, 2008). Neste estudo, encontramos duas bandas de CAPG, ambas com expressão aumentada. Kang e colaboradores (2010) também observaram aumento da expressão de CAPG em tumores mamários em relação ao epitélio mamário não tumoral, assim como Renz e colaboradores (2008), especialmente em câncer de mama com potencial metastático.

A vimentina (VIME) é um filamento intermediário tipo III que mantém a integridade celular e tecidual (COULOMBE & WONG, 2004) e tem forte expressão

em carcinomas ductais de alto grau ou tumores com baixos níveis de receptor de estrogênio (LIU *et al.*, 2015). A superexpressão de vimentina é interpretada como sinal de transição epitélio-mesenquimal, fenômeno em que a célula sofre um retorno da diferenciação adquirindo características de célula mesenquimal e com isso aumenta seu potencial de crescimento, invasão e metástase em diversos tipos de câncer, inclusive de mama (SATELLI & LI, 2011). Estudos com metodologias proteômicas relataram várias bandas de vimentina em géis de uma mesma amostra (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007; MILIOLI *et al.*, 2015), provavelmente decorrentes de modificações pós traducionais (PTM). Neste estudo, também observamos a presença de vimentina em 10 bandas, algumas mais expressas no tecido tumoral e outras no não tumoral. Mais estudos a respeito das alterações funcionais em decorrência de PTM são necessários para compreender a atuação dessas isoformas, pois apesar de correlacionada à malignidade o papel da vimentina na regulação do câncer ainda é incerto.

A expressão aumentada de sorotransferrina (TRFE) no carcinoma mamário já foi observada por imunohistoquímica (FAULK *et al.*, 1980) e por imunoensaio em aspirado de fluido mamilar e de soro (MANELLO *et al.*, 2011). A principal função de TRFE é o transporte de ferro, proveniente da alimentação e da reciclagem de macrófagos, até as células em crescimento (VAN CAMPENHOUT *et al.*, 2003). O ferro livre pode ser tóxico, pois promove a formação de radicais livres, resultando em danos aos tecidos (RICE-EVANS, 1993), e também causa a peroxidação de lipídeos por converter hidroperóxidos nos radicais reativos peroxil e alcoxil (GOMME *et al.*, 2005). A expressão reduzida de TRFE em tecido tumoral observada no presente trabalho não está de acordo com os autores acima. Esta diminuição pode ser em decorrência do equilíbrio entre proteínas celulares e do soro. Considerando que o tecido não tumoral tem um número menor de células em comparação com o tecido tumoral, as proteínas do soro podem se tornar mais evidentes neste tecido (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007), levando a uma aparente diminuição. Desta forma, podemos considerar o método imunohistoquímico como o ideal para o estudo da expressão desta proteína.

A proteína WDR61 (WD *repeat* 61) é membro do complexo Fator Associado à Polimerase II – 1 (Paf1C), um complexo proteico conservado que atua em vários pontos da regulação transcricional da RNA polimerase II. Além da expressão gênica,

este complexo também atua na maturação do RNA, reparo de DNA e progressão do ciclo celular (TOMSON & ARNDT, 2013). *WD repeat* é um motivo estrutural de aproximadamente 40 aminoácidos terminado frequentemente em triptofano-ácido aspártico (W-D) (NEER *et al.*, 1994). Um estudo recente mostrou que WDR5, outra proteína contendo o motivo *WD repeat*, é necessária para que MYC se associe a genes alvo e comande a tumorigênese (THOMAS *et al.*, 2015). Há pouca informação a respeito da expressão de WDR61 em câncer de mama e no câncer de maneira geral. Contudo, pelo seu envolvimento em diversos processos celulares através do Paf1C, esta proteína deve ser observada com atenção.

Os últimos dois grupos de proteínas, as tropomiosinas (TPMs) e as dissulfito isomerases (PDIs), foram estudados por nosso grupo para validar os dados preliminares deste estudo. PCR quantitativa em tempo real, através do protocolo *Sybr green*, foi utilizada para analisar o nível de expressão de mRNA entre tecido mamário não tumoral e tumoral. Em relação às TPMs, observou-se redução na expressão de TPM1, aumento de TPM3 e nenhuma variação para expressão de TPM4 no tecido tumoral (CARVALHO, 2013), corroborando a análise proteômica apenas para TPM3. Nossos resultados mostram uma expressão aumentada destas três TPMs no tecido tumoral, assim como outros estudos proteômicos (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007; KABBAGE *et al.*, 2013). Alterações na expressão de TPMs contribuem para a reorganização de microfilamentos, modificações na morfologia e motilidade celular (HELFMAN *et al.*, 2008). Geralmente, a expressão reduzida de TPMs é associada ao desenvolvimento de câncer (FRANZÉN *et al.*, 1996; BHATTACHARYA *et al.*, 1990). Por apresentarem diversas isoformas (alto peso molecular e baixo peso molecular) produzidas por *splicing* alternativo, são necessários mais estudos sobre seus níveis de regulação, por exemplo, o transcrito de TPM1 foi apresentado como um potencial alvo para o mir-21 através de estudo com linhagem celular de câncer de mama (ZHU *et al.*, 2007).

Por outro lado, as PDIs corroboraram totalmente os dados obtidos na análise proteômica. *PDIA3* e *PDIA6* apresentaram maior expressão no tecido tumoral e *PDIA3* mostrou uma associação com metástase em linfonodo e grau do tumor, sugerindo seu potencial uso como marcador de agressividade (RAMOS *et al.*, 2015). PDIs atuam na formação e isomerização de ligações dissulfeto e também como chaperonas, por se ligarem a cadeias peptídicas e auxiliarem no seu dobramento

correto, evitando a formação de agregados (WILKINSON & GILBERT, 2004). Estas proteínas estão associadas a diversos tipos de câncer (AYSHAMGUL *et al.*, 2011; PRESSINOTTI *et al.*, 2009; LEYS *et al.*, 2007).

#### *Proteínas com expressão concordante com a literatura*

A Tabela 11 mostra a comparação entre nossos resultados e a literatura para todas as proteínas presentes em ao menos duas amostras. Vinte e uma delas se mostram de acordo com o observado na literatura.

Das dez proteínas com maior variação de expressão descritas na sessão anterior, seis corroboram o padrão de expressão observado em outros estudos. São elas: CASPE, ENOG, CAPG, VIME, PDIA3 e PDIA6.

PSME1 também foi observada com expressão aumentada em outros dois estudos proteômicos comparativos em câncer de mama (SOMIARI *et al.*, 2003; SUTTON *et al.*, 2010), mas há pouca informação sobre expressão de PSME2. Esta proteína se mostrou superexpressa em câncer gástrico (EBERT *et al.*, 2005) e carcinoma renal (PERROUD *et al.*, 2006) e com expressão reduzida em câncer de pulmão (HUANG *et al.*, 2010). Estas duas subunidades fazem parte do complexo regulatório 19S do proteassoma. A via de degradação proteassoma-ubiquitina controla a homeostase de proteínas e tem papel importante na regulação do ciclo celular e na resposta a estímulos pró-apoptóticos, pois dentre os substratos desta via estão proteínas supressoras de tumor, reguladoras do ciclo celular, moléculas de sinalização, fatores de transcrição, e proteínas anti-apoptóticas (RICHARDSON *et al.*, 2005).

A calreticulina (CALR) é uma chaperona bastante versátil e está envolvida na síntese de canais iônicos, receptores de superfície, integrinas e outras moléculas. Também desempenha papel importante na homeostase do cálcio intracelular, controlando o armazenamento e transporte do íon Ca<sup>2+</sup> no retículo endoplasmático (MICHALAK *et al.*, 1999). Também foi encontrada com expressão aumentada em outros estudos em câncer de mama (SONG *et al.*, 2012a; KABBAGE *et al.*, 2013).

As quatro proteínas da família 14-3-3 encontradas neste trabalho (1433G, 1433E, 1433T e 1433Z) corroboram as informações da literatura sobre a



superexpressão em câncer de mama (WULFKUHLE *et al.*, 2002; ALLDRIDGE *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2012b; LI *et al.*, 2014). Membros desta família reconhecem proteínas com resíduos de serina e treonina fosforilados, entre elas, fosfatases, quinases e receptores transmembrana, por isso tem função importante na regulação do ciclo celular e apoptose (FU *et al.*, 2000; HEMERT *et al.*, 2001).

A plastina-2 (PLSL) é membro da família das proteínas de ligação cruzada à actina (*actin-cross-linking protein*) e se concentra em estruturas de membrana ricas em actina envolvidas na locomoção e adesão celular e defesa imunológica (JANJI *et al.*, 2006). Em 1999, Zheng e colaboradores detectaram PLSL em tumores sólidos de origem epitelial e mesenquimal, propondo a participação desta proteína na invasão tumoral. Foi observado que a superexpressão de PLSL em células MCF-7 sensíveis a fatores de necrose tumoral (TNF) confere proteção contra a morte celular mediada por TNF (JANJI *et al.*, 2010). Lapillonne e cols. (2000) e Alldridge e cols. (2008) também encontraram esta proteína com expressão aumentada em tecido de carcinoma mamário.

Também conhecida como HSP27, a proteína *heat shock* beta-1 (HSPB1) também teve a expressão aumentada observada no câncer de mama em outros estudos (HUDELIST *et al.*, 2006; GRZEGRZOLKA *et al.*, 2012; CARCOFORO *et al.*, 2013). Ela faz parte da família Hsp20 de chaperonas moleculares e atua protegendo a estrutura e atividade das proteínas e geralmente acabam beneficiando os tumores, protegendo-os do estresse oxidativo e da desnaturação de proteínas, exercendo atividade anti-apoptótica e suprimindo o sistema imune (LAUDANSKI e WYCZECOWSKA, 2006). A alta expressão de HSPB1 já foi correlacionada com resistência à quimioterápicos utilizados para tratamento do câncer de mama, como a cisplatina e doxorubicina (SHI *et al.*, 2008).

A superexpressão da peroxiredoxina III (PRDX3) já foi relatada em vários tipos de câncer, inclusive na mama (NOH *et al.*, 2001; KARIHTALA *et al.*, 2003). Pertence a um grupo de enzimas antioxidantes que catalisam a redução de  $H^2O^2$  na presença de tioredoxina (HOFMANN *et al.*, 2002). O gene *PRDX3* foi identificado como alvo de indução por MYCC (WONSEY *et al.*, 2002). Em 2010, Chua e colaboradores verificaram associação da expressão de PRDX3 com a de PCNA, um marcador de proliferação celular, e que a depleção de PRDX3 em linhagem de célula de tumor mamário inibiu a proliferação e progressão do ciclo celular.

Os inibidores de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1) e 2 (GDIR2) foram os membros da família das Rho GDIs encontradas com expressão aumentada em nosso trabalho e corroboram os achados de outros estudos proteômicos em câncer de mama (FRITZ *et al.*, 2002; WULFKUHLE *et al.*, 2002; PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2010). Em estudo com linhagem celular, Zhang e cols. (2005a) observaram que o aumento da expressão de GDIR1 induziu o rompimento do citoesqueleto de actina e perda de aderência ao substrato. GDIR2 é importante no controle de pequenas GTPases como Ras1, Cdc42 e RhoA (SKALNIKOVA *et al.*, 2010), as quais regulam diversas funções celulares, por exemplo, polaridade celular, migração, apoptose e proliferação (MOISSOGLU *et al.*, 2009). Estudos também mostram expressão aumentada de GDIR2 em tecido linfonodo metastático em comparação ao tumor primário de mama (MILIOLI *et al.*, 2015) e no soro de pacientes com linfonodo positivo em relação ao negativo (HU *et al.*, 2009).

Apesar de não haver muita informação especificamente sobre a cadeia alfa-1B da tubulina (TBA1B), a cadeia alfa, em geral, foi encontrada superexpressa em lesões pré-malignas e em carcinomas de mama (NIU *et al.*, 2009). As tubulinas são as principais constituintes dos microtúbulos (heterodímeros alfa-beta tubulina), envolvidos na divisão celular, transporte intracelular e motilidade de cílios e flagelos (McKEAN *et al.*, 2001). A superfamília das tubulinas apresenta sequências bastante conservadas, sendo que cadeias alfa e beta apresentam entre 36-42% de similaridade (OAKLEY, 2000).

Componente do complexo Arp2/3, a proteína relacionada à actina 3 (ARP3) está envolvida na formação de protrusões de membrana observadas em células com capacidade de migração e invasão (YAMAGUCHI & CONDEELIS, 2007; GIRI *et al.*, 2013). A expressão aumentada de ARP3 também foi observada em carcinoma ductal *in situ*, apesar de ser definida como uma lesão pré-maligna, quando comparado com tecido mamário não tumoral (WULFKUHLE *et al.*, 2002).

A proteína DJ-1 (PARK7) tem sido relacionada a várias características da célula cancerosa, como proliferação, invasão, metástase, apoptose e resistência a drogas (CAO *et al.*, 2015). Foi encontrada superexpressa no citoplasma de células cancerosas e também no soro de pacientes com câncer de mama quando comparado com indivíduos saudáveis (LE NAOUR *et al.*, 2001). Um estudo recente

observou está proteínas com expressão aumentada em células altamente invasivas de câncer de mama em comparação a células não metastáticas (ISMAIL *et al.*, 2014).

#### *Proteínas conflitantes ou com pouca informação na literatura*

Das dez proteínas com maior variação de expressão previamente descritas, quatro apresentaram padrão de expressão conflitante com o observado em outros estudos. São elas: TPM1, TPM3, TRFE e WDR61.

Fibrinogênio, alfa-1 antitripsina (A1AT), haptoglobina (HPT) e a TRFE, discutidas anteriormente, são proteínas de fase aguda de processos inflamatórios. De acordo com Kushner (1982), são proteínas produzidas no fígado que tem aumento ou diminuição de sua concentração plasmática em pelo menos 25% nos sete primeiros dias após dano tecidual. A cadeia beta do fibrinogênio (FIBB) foi encontrada em duas bandas distintas e presentes em todas as amostras com expressão aproximadamente quatro vezes menor no tecido tumoral. Embora em posição diferente no gel, Somiari e cols. (2003) observaram FIBB com expressão aumentada em tumor de mama. Fibrinogênio, fibrina e seus produtos de degradação atuam na coagulação sanguínea, inflamação, angiogênese e metástase (MOESSON, 2005) e tem sido demonstrado que o fibrinogênio participa na indução de sinais proliferativos e, conseqüentemente promove respostas celulares de adesão, proliferação e migração durante o processo de cicatrização e crescimento tumoral (AKAKURA *et al.*, 2006). Contudo, sua função não é suficientemente conhecida.

Nosso estudo encontrou alfa-1 antitripsina (A1AT) com expressão aumentada no tumor, haptoglobina (HPT) e cadeia beta do fibrinogênio (FIBB) com expressão reduzida. Em 2009, Hamrita e colaboradores demonstraram aumento da expressão de duas isoformas de A1AT e quatro isoformas de HPT no soro de pacientes com carcinoma ductal infiltrante. Outra análise proteômica de soro sugere A1AT como potencial biomarcador de rastreamento e diagnóstico de câncer de mama em estágio inicial devido a sua expressão aumentada no soro de pacientes (LÓPEZ-ÁRIAS *et al.*, 2012). Por outro lado, duas análises comparativas em tecido

mostraram expressão reduzida de A1AT (SOMIARI *et al.*, 2003; DENG *et al.*, 2006), ao contrário do nosso trabalho.

A pirofosfatase inorgânica (IPYR) foi encontrada com aumento de expressão em câncer de próstata (LEXANDER *et al.*, 2005) e também em câncer gástrico, onde apresentou relação com migração celular e pode ser um marcador de mau prognóstico neste câncer (JEONG *et al.*, 2002.) Entretanto, em estudo comparativo entre linhagens celulares de mama não tumoral e tumoral não se observou diferença na expressão de IPYR (SELICHAROVÁ *et al.*, 2007). Em estudo recente, foi demonstrado que o *knockdown* de *PPA1* (gene codificador de IPYR) reduziu a formação de colônias e a viabilidade de células MCF-7 (MISHRA *et al.*, 2015). Nossos resultados mostram que IPYR está superexpressa em amostras de câncer de mama, mostrando que estudos de validação são necessários para confirmar uma das três direções.

A expressão da subunidade beta da ATP sintase (ATPB) em câncer de mama possui dados controversos, com evidência de superexpressão (ALLDRIDGE *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008) e expressão reduzida (SUTTON *et al.*, 2010) em análise de tecido e sem alteração em estudo com linhagens celulares (SELICHAROVÁ *et al.*, 2007).

O fator de iniciação eucariótico 4A-1 (IF4A1) e a ribonucleoproteína nuclear heterogênea F (HNRPF) foram identificados na mesma banda superexpressa no tumor. IF4A1 é uma subunidade do complexo regulador de tradução eIF4F e tem função de helicase (LUO *et al.*, 2005). Estudos recentes apontam IF4A1 como um promissor alvo terapêutico em tumores de mama ER-negativos (MODELSKA *et al.*, 2015; STONELEY *et al.*, 2015). HNRPF atua na regulação de eventos de *splicing* alternativo por fazer parte dos complexos hnRNP. Outros membros destes complexos hnRPN foram observados com expressão aumentada (WULFKUHLE *et al.*, 2002; SUTTON *et al.*, 2010) em câncer de mama, mas faltam informações sobre a variação da expressão de HNRPF em câncer de mama. Um estudo em câncer colorretal verificou o aumento da expressão desta proteína em relação ao tecido não tumoral (BALASUBRAMANI *et al.*, 2006). Por estas proteínas terem sido encontradas juntas na banda 32 do nosso estudo, não foi possível afirmar se as duas estão superexpressas ou apenas uma delas.

A proteína mitocondrial QCR1 é um dos componentes do complexo citocromo b-c1, o qual atua na cadeia respiratória mitocondrial. Por isso, esta proteína está associada à geração de espécies reativas de oxigênio e sua desregulação pode gerar diversos problemas, inclusive câncer (XIA *et al.*, 2013). Em carcinoma hepatocelular, QCR1 foi encontrada com expressão aumentada (KHAN *et al.*, 2013), mas também não há informação em câncer de mama. Porém, QCR2 apresentou redução de expressão em CDI comparado com tecido mamário não tumoral (PUTIGNANI *et al.*, 2008) e amplificação do gene *UQCRFS1*, codificante de UCRI, foi associada a tumores de mama de alto grau (OHASHI *et al.*, 2004). Tanto QCR2 como UCRI também são componente do complexo citocromo b-c1.

Dois tipos de subunidade alfa do proteassoma (PSA3 e PSA5) foram encontradas com expressão aumentada no tecido tumoral em nosso estudo. As subunidades alfa estão envolvidas na composição da porção 20S do proteassoma e, junto com a porção 19S, formam o proteassoma 26S que participa de diversos processos biológicos incluindo progressão do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (MURATA *et al.*, 2009). Apesar da sua importância como subunidades do proteassoma, faltam informações sobre alterações na expressão de PSA3 e PSA5 no câncer de mama.

A função da proteína TCPE no câncer é desconhecida, mas esta subunidade proteica participa do complexo TCP1 *ring* (TRiC). Evidências sugerem que TRiC desempenha papel chave na progressão do ciclo celular e que possa estar envolvido no desenvolvimento tumoral (WON *et al.*, 1998; HANSEN *et al.*, 2002; BOUDIAF-BENMAMMAR *et al.*, 2013). Em estudo recente, células NIH/3T3 (linhagem de fibroblastos) foram estimuladas com óxido nítrico (NO) para verificar se este induz a expressão de proteínas de efeito pró ou anti-câncer e TCPE foi encontrada com expressão aumentada, apesar de não se saber o efeito dela para o câncer (SHIM *et al.*, 2015).

#### **7.1.1. Classes funcionais**

Para esta classificação foram consideradas todas as proteínas identificadas no trabalho, não apenas aquelas observadas em ao menos duas amostras.

As categorias utilizadas para a classificação das proteínas identificadas foram baseadas em dois estudos do mesmo grupo. O primeiro elaborou um catálogo de proteínas encontradas no perfil proteômico de uma linhagem celular neoplásica de tecido mamário (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006); e o segundo realizou análise comparativa entre tecido tumoral e não tumoral (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007). O critério escolhido foi baseado nas principais funções biológicas que cada proteína apresenta de acordo com a literatura.

De acordo com a classificação funcional apresentada na Figura 10, as principais classes de proteínas superexpressas no tecido tumoral foram “Enzimas metabólicas” (21%) e “Citoesqueleto e proteínas associadas” (20%), enquanto as principais classes de proteínas com expressão reduzida no tecido tumoral foram “Proteínas com função de ligação” (33%) e “Citoesqueleto e proteínas associadas” (17%).

É possível perceber que as proteínas relacionadas ao citoesqueleto apresentam grande variação de expressão entre o tecido tumoral e não tumoral, sendo conhecida a sua importância para a capacidade de invasão de células cancerosas. O aumento na expressão do grupo das “Enzimas metabólicas” também pode estar relacionado à alta taxa metabólica das células tumorais em comparação com as células não tumorais do tecido mamário.

A classe “Proteínas com função de ligação” foi a mais expressiva entre as que apresentaram expressão reduzida nos tumores. Esta classe é bastante ampla, abrangendo desde proteínas que se ligam a íons e outras moléculas para transportá-las pela corrente sanguínea para outros tecidos até proteínas com domínios de ligação a RNA e DNA. Se fosse apenas a primeira situação, seria sensato sugerir que a menor celularidade do tecido não tumoral faz com que essas proteínas presentes no sangue se destaquem em relação ao tecido tumoral. Por outro lado, se fossem apenas proteínas de ligação que estivessem restritas ao ambiente intracelular seria aceitável sugerir que a baixa expressão dessa classe em geral é condição necessária para o desenvolvimento do tumor.

É difícil comparar a distribuição funcional das proteínas com outros autores, visto que os métodos e parâmetros de classificação nem sempre são homogêneos. Recentemente alguns trabalhos têm utilizado o sistema de classificação PANTHER

(MI *et al.*, 2013) que utiliza informações do *Gene Ontology* (GO). O GO é uma iniciativa de unificar a representação de genes e seus produtos entre todas as espécies e é dividido em três categorias: 1-Processo biológico; 2-Função molecular; e 3-Componente celular (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2008). Neste trabalho, mantivemos o modelo de classificação que já foi utilizado pelo nosso grupo em trabalhos anteriores.

Como algumas proteínas podem apresentar várias funções biológicas distintas e, com o desenvolvimento de novas pesquisas, funções atualmente estabelecidas podem ser refugadas e substituídas por outras, e estas classificações funcionais devem ser tratadas com cuidado e revisadas na literatura a cada novo estudo (OU *et al.*, 2008).

## **7.2. Análise da expressão *STIP1* por RT-qPCR e WB**

Várias proteínas foram identificadas em somente uma amostra com expressão diferencial estatisticamente significativa. Apesar de termos adotado o critério de compararmos somente aquelas presentes em pelo menos duas amostras, destacamos a relevância de algumas destas proteínas devido à sua importante função celular. Como exemplo, temos a proteína *STIP1* que foi selecionada para verificações posteriores devido ao crescente interesse na literatura e pelos interessantes dados já gerados em estudos anteriores pelo grupo do Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia Básica (equipe do professor Silvio Zanata). Em colaboração com este grupo, foram realizadas as análises de *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-*STIP1* (coelho) produzido no Laboratório de Neurobiologia.

Até o momento só há estudos com linhagens celulares publicados sobre o envolvimento de *STIP1* no câncer de mama. Sims e colaboradores (2011), trabalhando com as linhagens MDA-MB-231 e HT-1080, observaram que esta proteína está presente no meio extracelular em complexo com Hsp90 $\alpha$ , sendo necessária para a ativação da metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) mediada por Hsp90 $\alpha$ . A MMP2 atua na degradação do substrato da matriz extracelular (BARTSCH *et al.*, 2003), sendo importante para a motilidade celular e com função

bem conhecida na metástase (JEZIERSKA & MOTYL, 2009). Em 2013, Willmer e colaboradores observaram que o *knockdown* de *STIP1* nas linhagens Hs578T e MDA-MB-231 levou à diminuição da formação de pseudopodia e da migração.

Se ainda são poucos estudos sobre *STIP1* em câncer de mama, a quantidade de trabalhos sobre esta proteína em outros tipos de câncer continua aumentando. A análise proteômica por eletroforese bidimensional de carcinomas hepatocelulares apresentou *STIP1* com expressão aumentada em relação ao tecido hepático adjacente (SUN *et al.*, 2007). Em estudo de 2007 com gliomas, Erlich e colaboradores mostraram que *STIP1* é secretada por células tumorais e induz a proliferação das mesmas, sendo este efeito modulado pela via MAPK e PI3K.

Após observar a superexpressão de *STIP1* tanto em linhagem celular como em tecido de carcinoma pancreático, Walsh e colaboradores, em 2011, observaram que fazendo o *knockdown* de *STIP1* por *small interference* RNA (siRNA) houve redução na invasão das células de câncer pancreático. *STIP1* também está envolvida na migração celular e angiogênese (LI *et al.*, 2012b).

A investigação desta proteína em câncer de ovário tem sido bastante expressiva. Em 2010, Wang e colaboradores mostraram que *STIP1* é secretada, apresentando níveis significativamente maiores em sangue periférico de pacientes com câncer de ovário do que em indivíduos controle. Em 2013, Chao e colaboradores sugeriram *STIP1* como biomarcador de prognóstico em estudo com pacientes de uma província de Taiwan. Ainda neste estudo, mostraram que células epiteliais de ovário têm proliferação celular e migração estimuladas quando tratadas com proteína *STIP1* recombinante. Estudos de imunohistoquímica e silenciamento gênico também apontam *STIP1* como potencial biomarcador de progressão tumoral e prognóstico ruim para câncer de ovário (CHO *et al.*, 2014).

Em relação aos nossos resultados, tanto na análise por WB como por RT-qPCR foi possível confirmar o aumento na expressão de *STIP1* no tecido tumoral em relação ao não tumoral, observado em apenas uma das amostras pareadas submetidas à análise por 2D-PAGE. Isto corrobora a informação da literatura para a expressão em carcinomas hepatocelulares (SUN *et al.*, 2007). Esta informação sugere que o aumento da expressão de *STIP1* seja um evento que ocorra nas etapas iniciais da tumorigênese. Nossos dados de WB não mostram diferença



estatisticamente significativa entre a expressão em tumor e linfonodo metastático, ou seja, a expressão de STIP1 se mantém elevada, também corroborando os efeitos desta proteína na migração celular e invasão.

A análise por RT-qPCR mostrou um aumento na expressão de RNAm de *STIP1* no tumor em relação ao linfonodo. Isto foi observado tanto na comparação entre amostras pareadas (n=8) quanto entre os grupos Tumor (n=53) e Linfonodo (n=8). Contudo, é sabido que não necessariamente os níveis proteicos são condizentes com os níveis de RNAm devido a possibilidade de regulação pós transcricional. O baixo número de amostras de linfonodo pode ser o responsável por essa diferença.

### **7.3. Perspectivas**

Através dos dados obtidos na análise proteômica abrimos um leque de alvos para futuros estudos dentro do nosso grupo de pesquisa, por exemplo, a verificação das vias de sinalização mais representadas pelas proteínas diferencialmente expressas identificadas neste trabalho ou o estudo de genes e proteínas em amostras de pacientes e linhagens celulares.

O aumento do número amostral e investigação da expressão de STIP1 em diferentes subgrupos moleculares também se faz necessário para avaliar a relação desta proteína com outros parâmetros, bem como para validação de STIP1 como biomarcador para câncer de mama.

Já iniciamos a padronização da análise imunohistoquímica em tecido não tumoral, tumoral e de linfonodo para complementar as análises aqui descritas. Como STIP1 é uma proteína expressa no citoplasma, núcleo e membrana, essa será uma informação importante para verificar como se dá a distribuição desta proteína nos três tecidos. Outra abordagem que já está em andamento é a tentativa de detectar STIP1 no soro pela técnica de ELISA e verificar se esta proteína pode ser utilizada como marcador de diagnóstico.

## 8. CONCLUSÕES

- Pela análise proteômica comparativa, identificamos mais de cem proteínas diferencialmente expressas entre o tecido mamário não tumoral e o tumoral. Destacamos dez delas como de potencial importância nos carcinomas mamários devido à grande diferença de expressão, além de discutirmos outras também de relevância. Entre estas, estudamos mais efetivamente a proteína STIP1. Estes dados contribuem de forma consistente com a literatura do proteoma do tecido mamário, seja do tecido não tumoral, seja do carcinoma ductal invasor, com perspectivas para novos estudos sobre o envolvimento das proteínas identificadas nos mecanismos básicos do câncer assim como de potenciais biomarcadores.
- A expressão de RNAm de *STIP1* mostrou-se diferente entre as amostras de tecido tumoral quando comparado ao tecido não tumoral e ao linfonodo, mas não houve diferença significativa em relação a quaisquer outros parâmetros avaliados, não se mostrando capaz de diferenciar subgrupos nesta amostra. Na comparação do tecido tumoral com o linfonodo se observou maior expressão no tumor.
- Na análise por WB, *STIP1* mostrou-se significativamente mais expressa em tecido tumoral do que no tecido não tumoral, não tendo sido observada a mesma diferença na expressão em amostras de tecido tumoral e no linfonodo metastático, o que sugere o envolvimento desta proteína desde os estágios iniciais da tumorigênese mamária.

**REFERÊNCIAS**

AKAKURA, N.; HOOGLAND, C.; TAKADA, Y. K.; SAEGUSA, J.; YE, X.; LIU, F. T.; CHEUNG, A. T.; TAKADA, Y. The COOH-terminal globular domain of fibrinogen gamma chain suppresses angiogenesis and tumor growth. **Cancer Research**, v. 66 n. 19, p. 9691-9697, 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4. ed. São Paulo: Artmed, São Paulo, 2004.

ALLDRIDGE, L.; METODIEVA, G.; GREENWOOD, C.; AL-JANABI, K.; THWAITES, L.; SAUVEN, P.; METODIEV, M. Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 4, p. 1458-1469, 2008.

ALLRED, D. C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alphapositive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 6, p. 240–245, 2004.

AMON, L. M.; PITTERI, S. J.; LI, C.; McINTOSH, M.; LADD, J. J.; DISIS, M.; PORTER, P.; WONG, C. H.; ZHANG, Q.; LAMPE, P.; PRENTICE, R. L.; HANASH, S. M. Concordant release of glycolysis proteins into the plasma preceding a diagnosis of ER+ breast cancer. **Cancer Res.**, v. 72, n. 8, p. 1935-42, 2012.

ARVOLD, N. D.; TAGHIAN, A. G.; NIEMIERKO, A.; ABI RAAD, R. F.; SREEDHARA, M.; NGUYEN, P. L.; BELLON, J. R.; WONG, J. S.; SMITH, B. L.; HARRIS, J. R. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. **J. Clin. Oncol.**, n. 29, v. 29, p. 3885–3891, 2011.

ASSELIN-LABAT, M. L.; SUTHERLAND, K. D.; VAILLANT, F.; GYORKI, D. E.; WU, D.; HOLROYD, S.; BRESLIN, K.; WARD, T.; SHI, W.; BATH, M. L.; DEB, S.; FOX, S. B.; SMYTH, G. K.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14. **Mol. Cell. Biol.**, v. 31, n. 22, p. 4609-4622, 2011.

ASSOCIAÇÃO DE ASSISTÊNCIA E PREVENÇÃO AO CÂNCER (AAPC) – disponível em <<http://www.aapcan.org.br>> Acesso em setembro de 2011.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.

AYSHAMGUL, H.; MA, H.; ILYAR, S.; ZHANG, L. W.; ABULIZI, A. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. **Chinese Medical Journal**, v. 124, n. 3, p. 341-346, 2011.

AZAD, N. F.; RASOOL, N.; ANNUNZIATA, C. M.; MINASIAN, L.; WHITELEY, G.; KOHN, E. C. Proteomics in clinical trials and practice – present uses and future promise. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, p. 1819-1829, 2006.

BADVE, S.; DABBS, D. J.; SCHNITT, S. J.; BAEHNER, F. L.; DECKER, T.; EUSEBI, V.; FOX, S. B.; ICHIHARA, S.; JACQUEMIER, J.; LAKHANI, S. R.; PALACIOS, J.; RAKHA, E. A.; RICHARDSON, A. L.; SCHMITT, F. C.; TAN, P. H.; TSE, G. M.; WEIGELT, B.; ELLIS, I. O.; REIS-FILHO, J. S. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Mod. Pathol.**, v. 24, n. 2, p. 157-167, 2011.

BAINDUR-HUDSON, S.; EDKINS, A. L.; BLATCH, G. L. Hsp70/Hsp90 organising protein (hop): beyond interactions with chaperones and prion proteins. **Subcell. Biochem.**, v. 78, p. 69-90, 2015.

BARTSCH, J. E.; STAREN, E. D.; APPERT, H. E. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. **J. Surg. Res.**, v. 110, n. 2, p. 383-392, 2003.

BALASUBRAMANI, M.; DAY, B. W.; SCHOEN, R. E.; GETZENBERG, R. H. Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 763-9, 2006.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics Supplement**, v. 33, p. 238-247, 2003.

BÁNKFALVI, A.; LUDWIG, A.; HESSELLE, B.; BUERGER, H.; BUCHWALOW, I. B.; BOECKER, W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. **Mod Pathol.**, v. 17, p. 1051-1061, 2004.

BATEMAN, A. C. Breast Pathology. **Surgery**. v. 25, n. 6, p. 245-250, 2007.

BAUER, J. A.; CHAKRAVARTHY, A. B.; ROSENBLUTH, J. M.; MI, D.; SEELEY, E. H.; DE MATOS GRANJA-INGRAM, N.; OLIVARES, M. G.; KELLEY, M. C.; MAYER, I. A.; MESZOELY, I. M.; MEANS-POWELL, J. A.; JOHNSON, K. N.; TSAI, C. J.; AYERS, G. D.; SANDERS, M. E.; SCHNEIDER, R. J.; FORMENTI, S. C.; CAPRIOLI, R. M.; PIETENPOL, J. A. Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 2, p. 681-690, 2010.

BAUW, G.; VAN DAMME, J.; PUYPE, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; GESSER, B.; RATZ, G. P.; LAURIDSEN, J. B.; CELIS, J. E. Protein electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 86, n. 20, p. 7701-7705, 1989.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1988.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, p. 1772-1786, 2006.

BHATTACHARYA, B.; PRASAD, G. L.; VALVERIUS, E. M.; SALOMON, D. S.; COOPER, H. L. Tropomyosins of human mammary epithelial cells - consistent defects of expression in mammary carcinoma cell lines. **Cancer Research**, v. 50, n. 7, p. 2105-2112, 1990.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 69, p. 89-95, 2001.

BLATCH, G. L.; LÄSSLE, M.; ZETTER, B. R.; KUNDRA, V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**, v. 194, n. 2, p. 277-282, 1997.

BOCCARDO, F.; RUBAGOTTI, A.; NUZZO, P. V.; ARGELLATI, F.; SAVARINO, G.; ROMANO, P.; DAMONTE, G.; ROCCO, M.; PROFUMO, A. Matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) TOF analysis identifies serum Angiotensin II concentrations as a strong predictor of all-cause and breast cancer (BCa)-specific mortality following breast surgery. **Int. J. Cancer**, 2015. No prelo.

BOUDIAF-BENMAMMAR, C.; CRESTEIL, T.; MELKI, R. The cytosolic chaperonin CCT/TRiC and cancer cell proliferation. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60895, 2013.

BÖHM, D.; KELLER, K.; WEHRWEIN, N.; LEBRECHT, A.; SCHMIDT, M.; KÖLBL, H.; GRUS, F. H. Serum proteome profiling of primary breast cancer indicates a specific biomarker profile. **Oncol. Rep.**, v. 26, n. 5, p. 1051-1056, 2011.

BOSE, R.; MOLINA, H.; PATTERSON, A. S.; BITOK, J. K.; PERIASWAMY, B.; BADER, J. S.; PANDEY, A.; COLE, P. A. Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 26, p. 9773-9778, 2006.

BOYER, A. P.; COLLIER, T. S.; VIDAUSKY, I.; BOSE, R. Quantitative proteomics with siRNA screening identifies novel mechanisms of trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancers. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 180-193, 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUDEL, V. M. Anatomia cirúrgica da mama. In: RIETJENS, M.; URBAN, C. A. **Cirurgia da Mama Estética e Reconstructora**. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p. 360-363.

CABEZÓN, T.; GROMOVA, I.; GROMOV, P.; SERIZAWA, R.; TIMMERMANS WIELENGA, V.; KROMAN, N.; CELIS, J. E.; Moreira, J. M. Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 12, n. 2, p. 381-94, 2013.

CAO, J.; LOU, S.; YING, M.; YANG, B. DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. **Biochem. Pharmacol.**, v. 93, n. 3, p. 241-250, 2015.

CARCOFORO, P.; URA, B.; MISCHIATI, C.; SQUERZANTI, M.; LANZARA, V.; CERVELLATI, C.; CALZA, R.; DE LAURETO, P. P.; FRARE, E.; PORTINARI, M.; FERIOTTO, G.; LANZARA, S.; AGOSTINELLI, E.; BERGAMINI, C. M. Comparative proteomic analysis of ductal breast carcinoma demonstrates an altered expression of chaperonins and cytoskeletal proteins. **Mol. Med. Rep.**, v. 7, n. 5, p. 1700-1704, 2013.

CAREY, L. A.; PEROU, C. M.; LIVASY, C. A.; DRESSLER, L. G.; COWAN, D.; CONWAY, K.; KARACA, G.; TROESTER, M. A.; TSE, C. K.; EDMISTON, S.; DEMING, S. L.; GERADTS, J.; CHEANG, M. C.; NIELSEN, T. O.; MOORMAN, P. G.; EARP, H. S.; MILLIKAN, R. C. Race, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. **JAMA**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502, 2006.

CARON, M.; IMAM-SGHIOUAR, N.; POIRIER, F.; LE CAËR, J. P.; LABAS, V.; JOUBERT-CARON, R. Proteomic map and database of lymphoblastoid proteins. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 771, n. 1-2, p. 197-209, 2002.

CARVALHO, C. M. S. *Análise da expressão gênica de Tropomiosinas em carcinomas mamários*. Dissertação (Mestrado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

CEBRIAN, A.; PHAROAH, P. D.; AHMED, S.; ROPERO, S.; FRAGA, M. F.; SMITH, P. L.; CONROY, D.; LUBEN, R.; PERKINS, B.; EASTON, D. F.; DUNNING, A. M.; ESTELLER, M.; PONDER, B. A. J. Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p. 1661-1669, 2006.

CELIS, J. E.; CABEZÓN, T.; MOREIRA, J. M.; GROMOV, P.; GROMOVA, I.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; IWASE, T.; AKIYAMA, F.; HONMA, N.; RANK, F. Molecular characterization of apocrine carcinoma of the breast: validation of an apocrine protein signature in a well-defined cohort. **Mol. Oncol.**, v. 3, n. 3, p. 220-237, 2009.

CELIS, J. E.; GROMOV, P.; CABEZÓN, T.; MOREIRA, J. M.; FRIIS, E.; JIRSTRÖM, K.; LLOMBART-BOSCH, A.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; RANK, F.; GROMOVA, I. 15-prostaglandin dehydrogenase expression alone or in combination with ACSM1 defines a subgroup of the apocrine molecular subtype of breast carcinoma. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1795-1809, 2008.

CELIS, J. E.; GROMOVA, I.; CABEZÓN, T.; GROMOV, P.; SHEN, T.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; RANK, F.; MOREIRA, J. M. Identification of a subset of breast carcinomas characterized by expression of cytokeratin 15: relationship between CK15+ progenitor/amplified cells and pre-malignant lesions and invasive disease. **Mol. Oncol.**, v. 1, n. 3, p. 321-349, 2007.

CHA, S.; IMIELINSKI, M. B.; REJTAR, T.; RICHARDSON, E. A.; THAKUR, D.; SGROI, D. C.; KARGER, B. L. In situ proteomic analysis of human breast cancer epithelial cells using laser capture microdissection: annotation by protein set enrichment analysis and gene ontology. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2529-2544, 2010.

CHAHED, K.; KABBAGE, M.; HAMRITA, B.; GUILLIER, C. L.; TRIMECHE, M.; REMADI, S.; EHRET-SABATIER, L.; CHOUCANE, L. Detection of protein alterations in male breast cancer using two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: the involvement of several pathways in tumorigenesis. **Clin. Chim. Acta.**, v. 388, n. 1-2, p. 106-114, 2008.

CHANG, H. C.; NATHAN, D. F.; LINDQUIST, S. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 318–325, 1997.

CHAO, A.; LAI, C. H.; TSAI, C. L.; HSUEH, S.; HSUEH, C.; LIN, C. Y.; CHOU, H. H.; LIN, Y. J.; CHEN, H. W.; CHANG, T. C.; WANG, T. H. Tumor stress-induced phosphoprotein1 (STIP1) as a prognostic biomarker in ovarian cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57084, 2013.

CHARPIN, C.; GIUSIANO, S.; SECQ, V.; CARPENTIER, S.; ANDRAC, L.; LAVAUT, M. N.; ALLASIA, C.; BONNIER, P.; GARCIA, S. Quantitative immunocytochemical profile to predict early outcome of disease in triple-negative breast carcinomas. **Int. J. Oncol.**, v. 34, n. 4, p. 983-993, 2009.

CHO, H.; KIM, S.; SHIN, H. Y.; CHUNG, E. J.; KITANO, H.; PARK, J. H.; PARK, L.; CHUNG, J. Y.; HEWITT, S. M.; KIM, J. H. Expression of Stress-Induced Phosphoprotein1 (STIP1) is Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 53, p. 277-288, 2014.

CHUA, P. J.; LEE, E. H.; YU, Y.; YIP, G. W.; TAN, P. H.; BAY, B. H. Silencing the Peroxiredoxin III gene inhibits cell proliferation in breast cancer. **Int. J. Oncol.**, v. 36, n. 2, p. 359-364, 2010.

CLARKE, M. F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1111-1115, 2006.

COLEMAN, M. P.; QUARESMA, M.; BERRINO, F.; LUTZ, J. M.; DE ANGELIS, R.; CAPOCACCIA, R.; BAILI, P.; RACHET, B.; GATTA, G.; HAKULINEN, T.; MICHELI, A.; SANT, M.; WEIR, H. K.; ELWOOD, J. M.; TSUKUMA, H.; KOIFMAN, S.; E SILVA, G. A.; FRANCISCI, S.; SANTAQUILANI, M.; VERDECCHIA, A.; STORM, H. H.; YOUNG, J. L.; CONCORD WORKING GROUP. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncol.**, v. 9, n. 8, p. 730-756, 2008.

COLLINS, J. A.; BLAKE, J. M.; CROSIGNANI, P. G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Human Reprod. Update**. v. 11, n. 6, p. 545-560, 2005.

COSTA, GG. *Análise proteômica de tecido mamário não tumoral em pacientes com câncer de mama*. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.



COURTILLOT, C.; PLU-BUREAU, G.; BINART, N.; BALLEYGUIER, C.; SIGAL-ZAFRANI, B.; GOFFIN, V.; KUTTENN, F.; KELLY, P. A.; TOURAINE, P. Benign breast diseases. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v. 10, p. 325-335, 2005.

CRESPI, B.; SUMMERS, K. Evolutionary biology of cancer. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 10, p. 545-552, 2005.

DAVIS, M. A. & HANASH, S. High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer: Plasma-based proteomics in early detection and therapy. **Breast Cancer Research**, v. 8:217, 2006.

DE SOUZA, L. E.; MOURA COSTA, M. D.; BILEK, E. S.; LOPES, M. H.; MARTINS, V. R.; PÜSCHEL, A. W.; MERCADANTE, A. F.; NAKAO, L. S.; ZANATA, S. M. ST11 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Exp Cell Res.**, v. 324, n. 1, p. 84-91, 2014.

DENG, S. S.; XING, T. Y.; ZHOU, H. Y.; XIONG, R. H.; LU, Y. G.; WEN, B.; LIU, S. Q.; YANG, H. J. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 4, n. 3, p. 165-172, 2006.

DONTU, G.; AL-HAJJ, M.; ABDALLAH, W. M.; CLARKE, M. F.; WICHA, M. S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell proliferation**, v. 36 (Suppl. 1), p. 59-72, 2003.

DUFLOTH, R. M.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J. K.; SHINZATO, J. Y.; SANTOS, C. C.; ZEFERINO, L. C.; SCHMITT, F. Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, p. 192-197, 2005.

DUMONT, B.; CASTRONOVO, V.; PEULEN, O.; BLÉTARD, N.; CLÉZARDIN, P.; DELVENNE, P.; DE PAUW, E. A.; TURTOI, A.; BELLAHCÈNE, A. Differential proteomic analysis of a human breast tumor and its matched bone metastasis identifies cell membrane and extracellular proteins associated with bone metastasis. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 4, p. 2247-2260, 2012.

DURÁN, M. C.; VEJA, F.; MORENO-BUENO, G.; ARTIGA, M. J.; SANCHEZ, L.; PALACIOS, J.; RIDLEY, A.; TIMMS, J. F. Characterisation of tumoral markers correlated with ErbB2 (HER2/Neu) overexpression and metastasis in breast cancer. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 2, n. 9, p. 1313-1326, 2008.

EBERT, M. P.; KRUGER, S.; FOGERON, M. L.; LAMER, S.; CHEN, J.; PROSS, M.; SCHULZ, H. U.; LAGE, H.; HEIM, S.; ROESSNER, A.; MALFERTHEINER, P.; ROCKEN, C. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 1693-1704, 2005.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treat Rev.**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2015.

ERLICH, R. B.; KAHN, S. A.; LIMA, F. R. S.; MURAS, A. G.; MARTINS, R. A. P.; LINDEN, R.; CHIARINI, L. B.; MARTINS, V. R.; NETO, V. M. STI1 Promotes Glioma Proliferation Through MAPK and PI3K Pathways. **Glia**, v. 55, p. 1690–1698, 2007.

FAN, C.; OH, D. S.; WESSELS, L.; WEIGELT, B.; NUYTEN, D. S.; NOBEL, A. B.; VANT VEER, L. J.; PEROU, C. M. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 6, p. 560-569, 2006.

FAULK, W. P.; HIS, B. L.; STEVENS, P. J. Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. **The Lancet**, v. 2, p. 390-392, 1980.

FONSECA-SÁNCHEZ, M. A.; RODRÍGUEZ CUEVAS, S.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; BAUTISTA-PIÑA, V.; ARECHAGA OCAMPO, E.; HIDALGO MIRANDA, A.; QUINTANAR JURADO, V.; MARCHAT, L. A.; ALVAREZ-SÁNCHEZ, E.; PÉREZ PLASENCIA, C.; LÓPEZ-CAMARILLO, C. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. **Int J Oncol.**, v. 41, n. 2, p. 670-680, 2012.

FRANZÉN, B.; LINDER, S.; ALAIYA, A. A.; ERIKSSON, E.; URUY, K.; HIRANO, T.; OKUZAWA, K.; AUER, G. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions - down-regulation of cytokeratins. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 10, p. 1632-1638, 1996.

FRITZ, G.; BRACHETTI, C.; BAHLMANN, F.; SCHMIDT, M.; KAINA, B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. **Br. J. Cancer**, v. 87, n. 6, p. 635-644, 2002.

GARNIS, C.; BUYS, T. P.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**, v. 3, n. 9, 2004.

GEIGER, B.; TOKUYASU, K. T.; DUTTON, A. H.; SINGER, S. J. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles

terminate at cell membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 7, p. 4127-4131, 1980.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology project in 2008. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, n. (Database issue), p. D440-444, 2008.

GILLEY, D.; TANAKA, H.; HERBERT, B. S. Telomere dysfunction in aging and cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1000-1013, 2005.

GIRI, A.; BAJPAI, S.; TRENTON, N.; JAYATILAKA, H.; LONGMORE, G. D.; WIRTZ, D. The Arp2/3 complex mediates multigeneration dendritic protrusions for efficient 3-dimensional cancer cell migration. **FASEB J.**, v. 27, n. 10, p. 4089-4099, 2013.

GOMME, P. T.; McCANN, K. B.; BERTOLINI, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discov. Today**, v. 10, n. 4, p. 267-273, 2005.

GONZALEZ, R. M.; DALY, D. S.; TAN, R.; MARKS, J. R.; ZANGAR, R. C. Plasma biomarker profiles differ depending on breast cancer subtype but RANTES is consistently increased. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 20, n. 7, p. 1543-1551, 2011.

GREENWOOD, C.; METODIEVA, G.; AL-JANABI, K.; LAUSEN, B.; ALLDRIDGE, L.; LENG, L.; BUCALA, R.; FERNANDEZ, N.; METODIEV, M. V. Stat1 and CD74 overexpression is co-dependent and linked to increased invasion and lymph node metastasis in triple-negative breast cancer. **J. Proteomics**, v. 75, n. 10, p. 3031-3040, 2012.

GRIGUS, S.; BURNETT, B.; MARGOT, N.; PALTER, K. B. Drosophila homolog of Hsp70/Hsp90 Organizing Protein. GenBank accession number AF056198.1. NCBI. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF056198.1>>. Acesso em maio de 2015.

GROMOV, P.; GROMOVA, I.; BUNKENBORG, J.; CABEZON, T.; MOREIRA, J. M.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; ROEPSTORFF, P.; RANK, F.; CELIS, J. E. Up-regulated proteins in the fluid bathing the tumour cell microenvironment as potential serological markers for early detection of cancer of the breast. **Mol. Oncol.**, v. 4, n. 1, p. 65-89, 2010a.

GROMOV, P.; GROMOVA, I.; FRIIS, E.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; RANK, F.; SIMON, R.; SAUTER, G.; MOREIRA, J. M. Proteomic profiling of mammary

carcinomas identifies C7orf24, a gamma-glutamyl cyclotransferase, as a potential cancer biomarker. **J Proteome Res.**, v. 9, n. 8, p. 3941-3953, 2010b.

GROMOV, P.; MOREIRA, J. M. A.; GROMOVA, I. Proteomic analysis of tissue samples in translational breast cancer research. **Expert Rev. Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 285–302, 2014.

GROSS, M. & HESSEFORT, S. Purification and characterization of a 66-kDa protein from rabbit reticulocyte lysate which promotes the recycling of Hsp. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 16833-16841, 1996.

GRZEGRZOLKA, J.; KURNOL, K.; PIOTROW, P.; PULA, B.; KOBIERZYCKI, C.; PIOTROWSKA, A.; JABLONSKA, K.; WOJNAR, A.; RYS, J.; DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M. Hsp-27 expression in invasive ductal breast carcinoma. **Folia. Histochem. Cytobiol.**, v. 50, n. 4, p. 527-533, 2012.

GUO, Y.; FU, Z.; EYK, J. E. V. A proteomic primer for the clinician. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 4, p. 9-17, 2007.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.

HAJJ, G. N.; ARANTES, C. P.; DIAS, M. V.; ROFFÉ, M.; COSTA-SILVA, B.; LOPES, M. H.; PORTO-CARREIRO, I.; RABACHINI, T.; LIMA, F. R.; BERALDO, F. H.; PRADO, M. A.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 70, n. 17, p. 3211-3227, 2013.

HAMRITA, B.; CHAHED, K.; TRIMECHE, M.; GUILLIER, C. L.; HAMMANN, P.; CHAÏEB, A.; KORBI, S.; CHOUCANE, L. Proteomics-based identification of alpha1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. **Clin. Chim. Acta.**, v. 404, n. 2, p. 111-118, 2009.

HANSEN, W. J.; OHH, M.; MOSLEHI, J.; KONDO, K.; KAELIN, W. G.; WELCH, W. J. Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 1947-1960, 2002.

HE, J.; WHELAN, S. A.; LU, M.; SHEN, D.; CHUNG, D. U.; SAXTON, R. E.; FAULL, K. F.; WHITELEGGE, J. P.; CHANG, H. R. Proteomic-based biosignatures in breast cancer classification and prediction of therapeutic response. **Int. J. Proteomics**, out.

2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em maio de 2015.

HELFMAN, D. M.; FLYNN, P.; KHAN, P.; SAEED, A. Tropomyosin as a Regulator of Cancer Cell Transformation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 644, p. 124-131, 2008.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Signaling pathways in mammary gland development. **Developmental Cell**, v. 1, p. 467-475, 2001.

HERNADEZ, M. P.; SULLIVAN, W. P.; TOFT, D. O. The assembly and intermolecular properties of the Hsp70-Hsp90 molecular chaperone complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38294-38304, 2002.

HILDENBRAND, Z. L.; MOLUGU, S. K.; PAUL, A.; AVILA, G. A.; HERRERA, N.; XIAO, C.; COX, M. B.; BERNAL, R. A. High-yield expression and purification of the Hsp90-associated p23, FKBP52, HOP and SGT $\alpha$  proteins. **J.Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 878, n. 28, p. 2760-2764, 2010.

HOCHGRÄFE, F.; ZHANG, L.; O'TOOLE, S. A.; BROWNE, B. C.; PINESE, M.; PORTA CUBAS, A.; LEHRBACH, G. M.; CROUCHER, D. R.; RICKWOOD, D.; BOULGHOURJIAN, A.; SHEARER, R.; NAIR, R.; SWARBRICK, A.; FARATIAN, D.; MULLEN, P.; HARRISON, D. J.; BIANKIN, A. V.; SUTHERLAND, R. L.; RAFTERY, M. J.; DALY, R. J. Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 22, p. 9391-9401, 2010.

HODGKINSON, V. C.; AGARWAL, V.; ELFADL, D.; FOX, J. N.; McMANUS, P. L.; MAHAPATRA, T. K.; KNEESHAW, P. J.; DREW, P. J.; LIND, M. J.; CAWKWELL, L. Pilot and feasibility study: comparative proteomic analysis by 2-DE MALDI TOF/TOF MS reveals 14-3-3 proteins as putative biomarkers of response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive breast cancer. **J. Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2745-2752, 2012a.

HODGKINSON, V. C.; ELFADL, D.; AGARWAL, V.; GARIMELLA, V.; RUSSELL, C.; LONG, E. D.; FOX, J. N.; McMANUS, P. L.; MAHAPATRA, T. K.; KNEESHAW, P. J.; DREW, P. J.; LIND, M. J.; CAWKWELL, L. Proteomic identification of predictive biomarkers of resistance to neoadjuvant chemotherapy in luminal breast cancer: a possible role for 14-3-3 theta/tau and tBID? **J. Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1276-1283, 2012b.

HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biol Chem.**, v. 383, p. 347-364, 2002.

HONDERMARCK, H.; DOLLÉ, L.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; VERCOUTTER-EDOUART, A. S.; ADRIAENSSENS, E.; LEMOINE, J. Functional proteomics of breast cancer for signal pathway profiling and target discovery. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 4, p. 395-405, 2002.

HONDERMARCK, H. Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, p. 281-291, 2003.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; TOILLON, R. A.; BOURHIS, X. L. Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 4, p. 1403-1411, 2008.

HU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; ZHU, Z.; SHAO, Z.; ZENG, R.; XU, L. X.; Comparative Serum Proteome Analysis of Human Lymph Node Negative Positive Invasive Ductal Carcinoma. **OMICS**, v. 13, p. 1-10, 2009.

HUANG, Q.; HUANG, Q.; LIN, W.; LIN, J.; LIN, X. Potential roles for PA28beta in gastric adenocarcinoma development and diagnosis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 136, p. 1275-1282, 2010.

HUANG, T. C.; CHANG, H. Y.; HSU, C. H.; KUO, W. H.; CHANG, K. J.; JUAN, H. F: Targeting therapy for breast carcinoma by ATP synthase inhibitor aurovertin B. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 1433-1444, 2008.

HUDELIST, G.; SINGER, C. F.; PISCHINGER, K. I.; KASERER, K.; MANAVI, M.; KUBISTA, E.; CZERWENKA, K. F. Proteomic analysis in human breast cancer: identification of a characteristic protein expression profile of malignant breast epithelium. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1989-2002, 2006.

HUGHES, L.E.; MANSEL, R.E.; WEBSTER, D.J.T. Benign disorders and diseases of the breast—concepts and clinical management. **W.B. Saunders**, v. 2, p. 7–20, 2000.

IARC/OMS - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report**, 2008.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Falando sobre Câncer de Mama**, 66p. Rio de Janeiro, 2000.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)> Acesso em setembro de 2014.

ISMAIL, I. A.; KANG, H. S.; LEE, H. J.; KIM, J. K.; HONG, S. H. DJ-1 upregulates breast cancer cell invasion by repressing KLF17 expression. **Br. J. Cancer**, v. 110, n. 5, p. 1298-1306, 2014.

JANJI, B.; GIGANTI, A.; DE CORTE, V.; CATILLON, M.; BRUYNEEL, E.; LENTZ, D.; PLASTINO, J.; GETTEMANS, J.; FRIEDERICH, E. Phosphorylation on Ser5 increases the F-actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells. **J. Cell. Sci.**, v. 119, n. 9, p. 1947-1960, 2006.

JANJI, B.; VALLAR, L.; AL TANOURY, Z.; BERNARDIN, F.; VETTER, G.; SCHAFFNER-RECKINGER, E.; BERCHEM, G.; FRIEDERICH, E.; CHOUAIB, S. J. The actin filament cross-linker L-plastin confers resistance to TNF-alpha in MCF-7 breast cancer cells in a phosphorylation-dependent manner. **Cell. Mol. Med.**, v. 14, n. 6A, p. 1264-1275, 2010.

JEON, Y. R.; KIM, S. Y.; LEE, E. J.; KIM, Y. N.; NOH, D. Y.; PARK, S. Y.; MOON, A. Identification of annexin II as a novel secretory biomarker for breast cancer. **Proteomics**, v. 13, n. 21, p. 3145-3156, 2013.

JEONG, S. H.; KO, G. H.; CHO, Y. H.; LEE, Y. J.; CHO, B. I.; HA, W. S.; CHOI, S. K.; KIM, J. W.; LEE, C. W.; HEO, Y. S.; SHIN, S. H.; YOO, J.; HONG, S. C. Pyrophosphatase overexpression is associated with cell migration, invasion, and poor prognosis in gastric cancer. **Tumor Biol.**, v. 33, p. 1889-1898, 2012.

JEZIERSKA, A.; & MOTYL, T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, n. 2, p. RA32-40, 2009.

JOHNSON, B. D.; SCHUMACHER, R. J.; ROSS, E. D.; TOFT, D. O. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 6, p. 3679-3686, 1998.

JOHNSON, K. C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 619-628, 2005.

JOHNSON-THOMPSON, M. C. & GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 9-1224, 2000.

KABBAGE, M.; TRIMECHE, M.; BERGAOUI, S.; HAMMANN, P.; KUHN, L.; HAMRITA, B.; BEN NASR, H.; CHAIEB, A.; CHOUCANE, L.; CHAHED, K.

Calreticulin expression in infiltrating ductal breast carcinomas: relationships with disease progression and humoral immune responses. **Tumour Biol.**, v. 34, n. 2, p. 1177-1188, 2013.

KAMPINGA, H. H. Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 172, p. 1-42, 2006.

KANG, S.; KIM, M. J.; AN, H.; KIM, B. G.; CHOI, Y. P.; KANG, K. S.; GAO, M. Q.; PARK, H.; NA, H. J.; KIM, H. K.; YUN, H. R.; KIM, D. S.; CHO, N. H. Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 11, p. 5638-5645, 2010.

KARIHTALA, P.; MANTYNIEMI, A.; KANG, S. W.; KINNULA, V. L.; SOINI, Y. Peroxiredoxins in breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 3418-3424, 2003.

KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M. C.; VODUC, D.; SPEERS, C. H.; NIELSEN, T. O.; GELMON, K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J. Clin. Oncol.**, v. 28, n. 20, p. 3271-3277, 2010.

KHAN, R.; ZAHID, S.; WAN, Y. J.; FORSTER, J.; KARIM, A. B.; NAWABI, A. M.; AZHAR, A.; RAHMAN, M. A.; AHMED, N. Protein expression profiling of nuclear membrane protein reveals potential biomarker of human hepatocellular carcinoma. **Clin. Proteomics**, v. 10, n. 1, p. 6, 2013.

KIM, H.; COPE, M. B.; HERRING, R.; ROBINSON, G.; WILSON, L.; PAGE, G. P.; BARNES, S. 2D difference gel electrophoresis of prepubertal and pubertal rat mammary gland proteomes. **Journal of Proteome Research**, p. 4638–4650, n. 7, 2008.

KIRILLINA, M. P.; LOSKUTOVA, K. S.; INNOKENT'EVA, A. S.; LUSHNIKOVA, E. L.; NEPOMNYASHCHIKH, L. M. Immunohistochemical reactions of primary neuroendocrine breast cancer. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 158, n. 3, p. 368-370, 2015.

KRAJEWSKA, M.; KIM, H.; SHIN, E.; KENNEDY, S.; DUFFY, M. J.; WONG, Y. F.; MARR, D.; MIKOLAJCZYK, J.; SHABAIK, A.; MEINHOLD-HEERLEIN, I.; HUANG, X.; BANARES, S.; HEDAYAT, H.; REED, J. C.; KRAJEWSKI, S. Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 15, p. 5462-5471, 2005.

KUBOTA, H.; YAMAMOTO, S.; ITOH, E.; ABE, Y.; NAKAMURA, A.; IZUMI, Y.; OKADA, H.; IIDA, M.; NANJO, H.; ITOH, H.; YAMAMOTO, Y. Increased expression



of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, n. 6, p. 1003-1011, 2010.

KUSHNER, I. The phenomenon of the acute phase response. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 389, p. 39-48, 1982.

LAM, S. W.; JIMENEZ, C. R.; BOVEN, E. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. **Cancer Treat. Rev.**, v. 40, n. 1, p. 129-138, 2015.

LACEY, J. V. Jr.; KREIMER, A. R.; BUYS, S. S.; MARCUS, P. M.; CHANG, S. C.; LEITZMANN, M. F.; HOOVER, R. N.; PROROK, P. C.; BERG, C. D.; HARTGE, P.; PROSTATE, LUNG, COLORECTAL AND OVARIAN (PLCO) CANCER SCREENING TRIAL PROJECT TEAM. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC Cancer**, v. 9, n. 84, p. 1-8, 2009.

LAPILLONNE, A.; COUÉ, O.; FRIEDERICH, E.; NICOLAS, A.; DEL MAESTRO, L.; LOUVARD, D.; ROBINE, S.; SASTRE-GARAU, X. Expression patterns of L-plastin isoform in normal and carcinomatous breast tissues. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 5A, p. 3177-3182, 2000.

LAUDANSKI, K. & WYCZECHOWSKA, D. The distinctive role of small heat shock proteins in oncogenesis. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v. 54, n. 2, p. 103-111, 2006.

LAWRENCE, R. T.; PEREZ, E. M.; HERNÁNDEZ, D.; MILLER, C. P.; HAAS, K. M.; IRIE, H. Y.; LEE, S. I.; BLAU, C. A.; VILLÉN, J. The proteomic landscape of triple-negative breast cancer. **Cell Rep.**, v. 11, n. 4, p. 630-644, 2015.

LE NAOUR, F.; MISEK, D. E.; KRAUSE, M. C.; DENEUX, L.; GIORDANO, T. J.; SCHOLL, S.; HANASH, S. M. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3328-3335, 2001.

LEE, P.; SHABBIR, A.; CARDOZO, C.; CAPLAN, A. J. Sti1 and Cdc37 can stabilize Hsp90 in chaperone complexes with a protein kinase. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, n. 4, p. 1785-1792, 2004.

LLEXANDER, H.; PALMBERG, C.; AUER, G.; HELLSTRÖM, M.; FRANZÉN, B.; JÖRNVALL, H.; EGEVAD, L. Proteomic analysis of protein expression in prostate cancer. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 27, n. 5, p. 263-272, 2005.

LEYS, C. M.; NOMURA, S.; LAFLEUR, B. J.; FERRONE, S.; KAMINISHI, M.; MONTGOMERY, E.; GOLDENRING, J. R. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. **Surgery**, v. 141, n. 1, p. 41-50, 2007.

LI, C. I.; MIRUS, J. E.; ZHANG, Y.; RAMIREZ, A. B.; LADD, J. J.; PRENTICE, R. L.; McINTOSH, M. W.; HANASH, S. M.; LAMPE, P. D. Discovery and preliminary confirmation of novel early detection biomarkers for triple-negative breast cancer using preclinical plasma samples from the Women's Health Initiative observational study. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 135, n. 2, p. 611-618, 2012a.

LI, J.; SUN, X.; WANG, Z.; CHEN, L.; LI, D.; ZHOU, J.; LIU, M. Regulation of Vascular Endothelial Cell Polarization and Migration by Hop. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e36389, 2012b.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1823, p. 624-635, 2012c.

LI, N.; WANG, H.; FAN, J.; TONG, C.; YANG, J.; WEI, H.; YI, J.; LING, R. Overexpression of 14-3-3 $\theta$  promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in breast carcinoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 1, p. 249-257, 2014.

LIANG, S.; SINGH, M.; GAM, L. H. The Differential Expression of Aqueous Soluble Proteins in Breast Normal and Cancerous Tissues in Relation to Stage and Grade of Patients. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 516469, 2010.

LIU, C. Y.; LIN, H. H.; TANG, M. J.; WANG, Y. K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, 2015. No prelo.

LOI, S. Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers - What have we learnt? **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2813-2818, 2008.

LONGSHAW, V. M.; CHAPPLE, J. P.; BALDA, M. S.; CHEETHAM, M. E.; BLATCH, G. L. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. **J. Cell Sci.**, v. 117, n. 5, p. 701-710, 2004.

LÓPEZ-ÁRIAS, E.; AGUILAR-LEMARROY, A.; FELIPE JAVE-SUÁREZ, L.; MORGAN-VILLELA, G.; MARISCAL-RAMÍREZ, I.; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M.; ALVAREZ, A. H.; GUTIÉRREZ-ORTEGA, A.; HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, R. Alpha

1-antitrypsin: a novel tumor-associated antigen identified in patients with early-stage breast cancer. **Electrophoresis**, v. 33, n. 14, p. 2130-2137, 2012.

LU, M.; WHELAN, S. A.; HE, J.; SAXTON, R. E.; FAULL, K. F.; WHITELEGGE, J. P.; CHANG, H. R. Hydrophobic Proteome Analysis of Triple Negative and Hormone-Receptor-Positive-Her2-Negative Breast Cancer by Mass Spectrometer. **Clin. Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 93-103, 2010.

LU M.; WHITELEGGE, J. P.; WHELAN, S. A.; HE, J.; SAXTON, R. E.; FAULL, K. F.; CHANG, H. R. Hydrophobic Fractionation Enhances Novel Protein Detection by Mass Spectrometry in Triple Negative Breast Cancer. **J. Proteomics Bioinform.**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2010b.

LUO, Y.; ZHANG, J.; LIU, Y.; SHAW, A. C.; WANG, X.; WU, S.; ZENG, X.; CHEN, J.; GAO, Y.; ZHENG, D. Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. **Mol. Biotechnol.**, v. 29, n. 3, p. 233-244, 2005.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A.; SIMONE, P.; LIGI, D.; MEDDA, V. Iron-binding proteins and C-reactive protein in Nipple Aspirate Fluids: role of Iron-driven inflammation in breast cancer microenvironment? **Am. J. Transl. Res.**, v. 3, n. 1, p. 100-113, 2010.

MARCHIÒ, C.; DOWSETT, M.; REIS-FILHO, J. S. Revisiting the technical validation of tumour biomarker assays: how to open a Pandora's box. **BMC Medicine**, v. 9, p. 41, 2011.

MAREEL, M. & LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol. Rev.**, v. 83, p.337-376, 2003.

MARTIN, J. Chaperonin function--effects of crowding and confinement. **J. Mol. Recognit.**, v. 17, n. 5, p. 465-472, 2004.

MATSUSHIMA, S.; MORI, M.; ADACHI, Y.; MATSUKUMA, A.; SUGIMACHI, K. S100 protein positive human breast carcinomas: an immunohistochemical study. **J. Surg. Oncol.**, v. 55, p. 108-113, 1994.

McKEAN, P. G.; VAUGHAN, S.; GULL, K. The extended tubulin superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 1723-1733, 2001.

MERMELEKAS, G. & ZOIDAKIS, J. Mass spectrometry-based membrane proteomics in cancer biomarker discovery. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 14, n. 5, p. 549–563, 2014.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; CASAGRANDE, J. T.; THOMAS, P. D. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature Protocols**, v. 8, p. 1551-1566, 2013.

MILANESE, T. R.; HARTMANN, L. C.; SELLERS, T. A.; FROST, M. H.; VIERKANT, R. A.; MALONEY, S. D.; PANKRATZ, V. S.; DEGNIM, M. C.; VACHON, C. N.; REYNOLDS, C. A.; THOMPSON, R. A.; MELTON III, L. J.; GOODE, E. L.; VISSCHER, D. W. Age-Related Lobular Involution and Risk of Breast Cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 98, n. 22, p. 1600-1607, 2006.

MILIOLI, H. H.; SANTOS SOUSA, K.; KAVISKI, R.; DOS SANTOS OLIVEIRA, N. C.; DE ANDRADE URBAN, C.; DE LIMA, R. S.; CAVALLI, I. J.; DE SOUZA FONSECA RIBEIRO, E. M. Comparative proteomics of primary breast carcinomas and lymph node metastases outlining markers of tumor invasion. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 12, n. 2, p. 89-101, 2015.

MISHRA, D. R.; CHAUDHARY, S.; KRISHNA, B. M.; MISHRA, S. K. Identification of critical elements for regulation of Inorganic Pyrophosphatase (PPA1) in MCF7 Breast Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124864, 2015.

MODELSKA, A.; TURRO, E.; RUSSELL, R.; BEATON, J.; SBARRATO, T.; SPRIGGS, K.; MILLER, J.; GRÄF, S.; PROVENZANO, E.; BLOWS, F.; PHAROAH, P.; CALDAS, C.; Le QUESNE, J. The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. **Cell Death Dis.**, v. 6, p. e1603, 2015.

MOISSOGLU, K.; MCROBERTS, K. S.; MEIER, J. A.; THEODORESCU, D.; SCHWARTZ, M. A. Rho GDP dissociation inhibitor 2 suppresses metastasis via unconventional regulation of Rho GTPases. **Cancer Res.**, v. 69, p. 2838-2844, 2009.

MOON, H. G.; JEONG, S. H.; JU, Y. T.; JEONG, C. Y.; LEE, J. S.; LEE, Y. J.; HONG, S. C.; CHOI, S. K.; HA, W. S.; PARK, S. T.; JUNG, E. J. Up-regulation of RhoGDI2 in human breast cancer and its prognostic implications. **Cancer Res. Treat.**, v. 42, n. 3, p. 151-6, 2010.

MORCH, L. S.; STAHLBERG, C.; LOKKEGAARD, E.; HUNDRUP, Y. A.; OBEL, E. B.; GRONBAEK, M. Amount of alcohol, drinking pattern and breast cancer among Danish nurses. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, p. 54, 2005.

MOREIRA, J. M.; CABEZÓN, T.; GROMOVA, I.; GROMOV, P.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; MACHADO, I.; LLOMBART-BOSCH, A.; KROMAN, N.; RANK, F.; CELIS, J. E. Tissue proteomics of the human mammary gland: towards an abridged definition of the molecular phenotypes underlying epithelial normalcy. **Mol. Oncol.**, v. 4, n. 6, p. 539-561, 2010.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1894-1904, 2005.

MURAOKA, S.; KUME, H.; WATANABE, S.; ADACHI, J.; KUWANO, M.; SATO, M.; KAWASAKI, N.; KODERA, Y.; ISHITOBI, M.; INAJI, H.; MIYAMOTO, Y.; KATO, K.; TOMONAGA, T. Strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 8, p. 4201-4210, 2012.

MURATA, S.; YASHIRODA, H.; TANAKA, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 104-115, 2009.

MUTI, P. The role of endogenous hormones in the etiology and prevention of breast cancer: The epidemiological evidence. **RRCR**, v. 166, p. 245-256, 2005.

NAKSHATRI, H.; QI, G.; YOU, J.; KERRY, B.; SCHNEIDER, B.; ZON, R.; BUCK, C.; REGNIER, F.; WANG, M. Intrinsic subtype-associated changes in the plasma proteome in breast cancer. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 3, n. 11, p. 1305-1313, 2009.

NANDI, S.; GUZMAN, R. C.; YANG, J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92, p. 3650-3657, 1995.

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.

NEER, E. J.; SCHMIDT, C. J.; NAMBUDRIPAD, R.; SMITH, T. F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature**, v. 371, n. 6495, p. 306-313, 1994.

NESLAND, J.; HOLM, R.; JOHANNESSEN, J.; GOULD, V. Neuron-specific enolase immunostaining in the diagnosis of breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. Its usefulness and limitations. **J. Pathol.**, v. 148, p. 35-43, 1986.

NEUBAUER, H.; CLARE, S. E.; WOZNY, W.; SCHWALL, G. P.; POZNANOVIC, S.; STEGMANN, W.; VOGEL, U.; SOTLAR, K.; WALLWIENER, D.; KUREK, R.; FEHM, T.; CAHILL, M. A. Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1. **Breast Cancer Res.**, v. 10, n. 5, p. R85, 2008.

NICOLET, C. M. & CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p. 3638-3646, 1989.

NIU, Y.; LIU, T.; TSE, G. M.; SUN, B.; NIU, R.; LI, H. M.; WANG, H.; YANG, Y.; YE, X.; WANG, Y.; YU, Q.; ZHANG, F. Increased expression of centrosomal alpha, gamma-tubulin in atypical ductal hyperplasia and carcinoma of the breast. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 4, p. 580-587, 2009.

NOH, D. Y.; AHN, S. J.; LEE, R. A.; KIM, S. W.; PARK, I. A.; CHAE, H. Z. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. **Anticancer Res.**, v. 21, p. 2085-2090, 2001.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F.; **THOMPSON & THOMPSON: Genética Médica**, 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

OAKLEY, B. R.; An abundance of tubulins. **Trends Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 537-542, 2000.

O'BRIEN, K. M.; COLE, S. R.; TSE, C. K.; PEROU, C. M.; CAREY, L. A.; FOULKES, W. D.; DRESSLER, L. G.; GERADTS, J.; MILLIKAN, R. C. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 24, p. 6100-6110, 2010.

ODUNUNGA, O. O.; LONGSHAW, V. M.; BLATCH, G. L. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **BioEssays**, v. 26, p. 1058-1068, 2004.

OHASHI, Y.; KANEKO, S. J.; CUPPLES, T. E.; YOUNG, S. R. Ubiquinol cytochrome c reductase (UQCRFS1) gene amplification in primary breast cancer core biopsy samples. **Gynecol. Oncol.**, v. 93, n. 1, p. 54-58, 2004.

OLDENBURG, R. A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C. J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 63, p. 125-149, 2007.

OLIVEIRA, B. M., COORSSEN, J. R., MARTINS-DE-SOUZA, D. J. 2DE: the phoenix of proteomics. **Proteomics**, v. 104, p. 140-150, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) – disponível em <<http://www.who.int/en/> Acesso em setembro de 2012>.

OU, K.; YU, K.; KESUMA, D.; HOOI, M.; HUANG, N.; CHEN, W.; LEE, S. Y.; GOH, X. P.; TAN, L. K.; LIU, J.; SOON, S. Y.; RASHID, S. B. A.; PUTTI, T. C.; JIKUYA, H.; ICHIKAWA, T.; NISHIMURA, O.; SALTO-TELLEZ, M.; TAN, P. Novel breast cancer biomarkers identified by integrative proteomic and gene expression mapping, **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 1518-1528, 2008.

PAGE, M. J.; AMESS, B.; TOWNSEND, R. R.; PAREKH, R.; HERATH, A.; BRUSTEN, L.; ZVELEBIL, M. J.; STEIN, R. C.; WATERFIELD, M. D.; DAVIES, S. C.; O'HARE, M. J. Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. **Cell Biology**, v. 96, n. 22, p. 12589-12594, 1999.

PAVLOU, M. P.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 147-153, 2013.

PENG, X.; NELSON, E. S.; MAIERS, J. L.; DEMALI, K. A. New insights into vinculin function and regulation. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 287, p. 191-231, 2011.

PEARSON EDUCATION – disponível em <<http://pt.slideshare.net/gwrandall/163-ch-19lecturepresentation>>. Acesso em maio de 2015.

PÉREZ-LOPEZ, F. R.; CHEDRAUI, P.; HAYA, J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. **Reproductive Sciences**, v. 16, p. 7-19, 2009.

PEROU C.M. ; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PERROUD, B.; LEE, J.; VALKOVA, N.; DHIRAPONG, A.; LIN, P.; FIEHN, O.; KULTZ, D.; WEISS, R. H. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. **Mol. Cancer**, v. 5, p. 64, 2006.

PFEFFER, U.; ROMEO, F.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A. Prediction of breast cancer metastasis by genomic profiling: where do we stand? **Clin. Exp. Metastasis**, v. 26, p. 547–558, 2009.

PIETROWSKA, M.; MARCZAK, L.; POLANSKA, J.; BEHRENDT, K.; NOWICKA, E.; WALASZCZYK, A.; CHMURA, A.; DEJA, R.; STOBIECKI, M.; POLANSKI, A.; TARNAWSKI, R.; WIDLAK, P. Mass spectrometry-based serum proteome pattern analysis in molecular diagnostics of early stage breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 60, p. 1-13, 2009.

PIMIENTA, G.; HERBERT, K. M.; REGAN, L. A compound that inhibits the HOP-Hsp90 complex formation and has unique killing effects in breast cancer cell lines. **Mol. Pharm.**, n. 8, p. 2252–2261, 2011.

PITTERI, S. J.; AMON, L. M.; BUSALD BUSON, T.; ZHANG, Y.; JOHNSON, M. M.; CHIN, A.; KENNEDY, J.; WONG, C. H.; ZHANG, Q.; WANG, H.; LAMPE, P. D.; PRENTICE, R. L.; McINTOSH, M. W.; HANASH, S. M.; LI, C. I. Detection of elevated plasma levels of epidermal growth factor receptor before breast cancer diagnosis among hormone therapy users. **Cancer Res.**, v. 70, n. 21, p. 8598-8606, 2010.

POLANSKI, M.; ANDERSON, N. L. A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. **Biomark Insights**, v. 1, p. 1-48, 2007.

PRADET-BALADE, B.; BOULMÉ, F.; BEUG, H.; MÜLLNER, E. W.; GARCIA-SANZ, J. A. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? **Trends in Biochemical Science**, v. 26, n. 4, p. 225–229, 2001.

PRESSINOTTI, N. C.; KLOCKER, H.; SCHAFFER, G.; DUC LUU, V.; LUURUSCHHAUPT, M.; KUNER, R.; STEINER, E.; POUSTKA, A.; BARTSCH, G.; SULTMANN, H. Differential expression of apoptotic genes PDIA3 and MAP3K5 distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 1, p. 63-71, 2009.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A. M.; MINAFRA, S. Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. **Proteomics**, v. 6, p. 2609-2625, 2006.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; MARABETI, M. R.; ALBANESE, N. N.; DI CARA, G.; TAORMINA, P.; MARRAZZO, A. Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and nontumoral adjacent counterparts. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 1, p. 118-129, 2007.



PUTIGNANI L.; RAFFA, S.; PESCOSOLIDO, R.; AIMATI, L.; SIGNORE, F.; TORRISI, M. R.; GRAMMATICO, P. Alteration of expression levels of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in breast cancer cell mitochondria. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 110, n. 3, p. 439-452, 2008.

QIN, X. J. & LING, B. X. Proteomic studies in breast cancer. **Oncol. Lett.**, v. 3, n. 4, p. 735–743, 2012.

RAMOS, F. S.; SERINO, L. T. R.; CARVALHO, C. M. S.; LIMA, R. S.; URBAN, C. A.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F. PDIA3 and PDIA6 genes expression as an aggressiveness marker in primary ductal breast cancer. **Genet. Mol. Res.**, 2015. No prelo.

RENZ, M.; BETZ, B.; NIEDERACHER, D.; BENDER, H. G.; LANGOWSKI, J. Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 7, p. 1476-1482, 2008.

REXER, B. N.; HAM, A. J.; RINEHART, C.; HILL, S.; GRANJA-INGRAM NDE, M.; GONZÁLEZ-ANGULO, A. M.; MILLS, G. B.; DAVE, B.; CHANG, J. C.; LIEBLER, D. C.; ARTEAGA, C. L. Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. **Oncogene**, v. 30, n. 40, p. 4163-4174, 2011.

REZAUL, K.; THUMAR, J. K.; LUNDGREN, D. H.; ENG, J. K.; CLAFFEY, K. P.; WILSON, L.; HAN, D. K. Differential protein expression profiles in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer tissues using label-free quantitative proteomics. **Genes Cancer**, v. 1, n. 3, p. 251-271, 2010.

RHEA, J. M.; MOLINARO, R. J. Cancer Biomarkers: Surviving the journey from bench to bedside. **MLO Med. Lab. Obs.**, v. 43, n. 3, p. 10-12, 16, 18, 2011.

RICE-EVANS, C. Oxidised low density lipoproteins. In: POLI, G. (Ed.). *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, p. 323–339, 1993.

RICHARDSON, P. G.; MITSIADES, C.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Proteasome inhibition in the treatment of cancer. **Cell Cycle**, v. 4, n. 2, p. 290-296, 2005.

RICOLLEAU, G.; CHARBONNEL, C.; LODÉ, L.; LOUSSOUARN, D.; JOALLAND, M. P.; BOGUMIL, R.; JOURDAIN, S.; MINVIELLE, S.; CAMPONE, M.; DÉPORTE-FETY, R.; CAMPION, L.; JÉZÉQUEL, P. Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies

ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1963-1975, 2006.

RODRIGO, M. A.; ZITKA, O.; KRIZKOVA, S.; MOULICK, A.; ADAM, V.; KIZEK, R. MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: a review. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 95, p. 245-255, 2014.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M. C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. J. 2D gels still have a niche in proteomics. **Proteomics**, v. 88, p. 4-13, 2013.

RONNOV-JENSEN, L.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 69-125, 1996.

SAHAB, Z. J.; MAN, Y. G.; SEMAAN, S. M.; NEWCOMER, R. G.; BYERS, S. W.; SANG, Q. X. Alteration in protein expression in estrogen receptor alpha-negative human breast cancer tissues indicates a malignant and metastatic phenotype. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 27, n. 7, p. 493-503, 2010.

SANDERS, M. E.; DIAS, E. C.; XU, B. J.; MOBLEY, J. A.; BILLHEIMER, D.; RODER, H.; GRIGORIEVA, J.; DOWSETT, M.; ARTEAGA, C. L.; CAPRIOLI, R. M. Differentiating proteomic biomarkers in breast cancer by laser capture microdissection and MALDI MS. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 4, p. 1500-1507, 2008.

SATELLI, A. & LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 3033-3046, 2011.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.

SCHULZ, D. M.; BÖLLNER, C.; THOMAS, G.; ATKINSON, M.; ESPOSITO, I.; HÖFLER, H.; AUBELE, M. Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 7, p. 3430-3438, 2009.

SELICHAROVÁ, I.; SMUTNÁ, K.; SANDA, M.; UBIK, K.; MATOUSKOVÁ, E.; BURSÍKOVÁ, E.; BROZOVÁ, M.; VYDRA, J.; JIRÁČEK, J. 2-DE analysis of a new human cell line EM-G3 derived from breast cancer progenitor cells and comparison with normal mammary epithelial cells. **Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1549-1559, 2007.

SEMAAN, S. M.; WANG, X.; MARSHALL, A. G.; SANG, Q. X. Identification of Potential Glycoprotein Biomarkers in Estrogen Receptor Positive (ER+) and Negative (ER-) Human Breast Cancer Tissues by LC-LTQ/FT-ICR Mass Spectrometry. **J. Cancer**, v. 3, p. 269-284, 2012.

SHI, P.; WANG, M. M.; JIANG, L. Y.; LIU, H. T.; SUN, J. Z. Paclitaxel-doxorubicin sequence is more effective in breast cancer cells with heat shock protein 27 overexpression. **Chin. Med. J.**, v. 121, p. 1975-1979, 2008.

SHIM, D. H.; LIM, J. W.; KIM, H. Differentially expressed proteins in nitric oxide-stimulated NIH/3T3 fibroblasts: implications for inhibiting cancer development. **Yonsei Med. J.**, v. 56, n. 2, p. 563-571, 2015.

SILACCI, P.; MAZZOLAI, L.; GAUCI, C.; STERGIOPULOS, N.; YIN, H. L.; HAYOZ, D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 2614-2623, 2004.

SIMS, J. D.; McCREADY, J.; JAY, D. G. Extracellular Heat Shock Protein (Hsp)70 and Hsp90 $\alpha$  Assist in Matrix Metalloproteinase-2 Activation and Breast Cancer Cell Migration and Invasion. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18848, 2011.

SJÖSTRÖM, M.; OSSOLA, R.; BRESLIN, T.; RINNER, O.; MALMSTRÖM, L.; SCHMIDT, A.; AEBERSOLD, R.; MALMSTRÖM, J.; NIMÉUS, E. A Combined Shotgun and Targeted Mass Spectrometry Strategy for Breast Cancer Biomarker Discovery. **J. Proteome Res.**, 2015. No prelo.

SKALNIKOVA, H.; MARTINKOVA, J.; HRABAKOVA, R.; HALADA, P.; DZIECHCIARKOVA, M.; HAJDUCH, M.; GADHER, S. J.; HAMMAR, A.; ENETOFT, D.; EKEFJARD, A.; FORSSTROM-OLSSON, O.; KOVAROVA, H. Cancer Drug-Resistance and a Look at Specific Proteins: Rho GDP dissociation inhibitor 2, Y-Box binding protein 1, and HSP70/90 Organizing Protein in Proteomics Clinical Application. **J. Proteome. Res.**, v. 10, p. 404-415, 2010.

SMITH, T. R.; MILLER, M. S.; LOHMAN, K. K.; CASE, L. D.; HU, J. J. DNA damage and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 883-889, 2003.

SOARES, I. N.; CAETANO, F. A.; PINDER, J.; RODRIGUES, B. R.; BERALDO, F. H.; OSTAPCHENKO, V. G.; DURETTE, C.; PEREIRA, G. S.; LOPES, M. H.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; CUNHA, I. W.; SANEMATSU, P. I.; SUZUKI, S.; BLEGGI-TORRES, L. F.; SCHILD-POULTER, C.; THIBAUT, P.; DELLAIRE, G.; MARTINS, V. R.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 12, n. 11, p. 3253-3270, 2013.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**, 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

SONG, H. O.; LEE, W.; AN, K.; LEE, H. S.; CHO, J. H.; PARK, Z. Y.; AHNN, J. C. *elegans* STI-1, the homolog of Sti1/Hop, is involved in aging and stress response. **J. Mol. Biol.**, v. 394, n. 4, p. 604-617, 2009.

SONG, M. N.; MOON, P. G.; LEE, J. E.; NA, M.; KANG, W.; CHAE, Y. S.; PARK, J. Y.; PARK, H.; BAEK, M. C. Proteomic analysis of breast cancer tissues to identify biomarker candidates by gel-assisted digestion and label-free quantification methods using LC-MS/MS. **Arch. Pharm. Res.**, v. 35, n. 10, p. 1839-1847, 2012a.

SONG, Y.; YANG, Z.; KE, Z.; YAO, Y.; HU, X.; SUN, Y.; LI, H.; YIN, J.; ZENG, C. Expression of 14-3-3 $\gamma$  in patients with breast cancer: correlation with clinicopathological features and prognosis. **Cancer Epidemiol.**, v. 36, n. 6, p. 533-536, 2012b.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P. E.; BORRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 10869-10874, 2001.

SOMIARI, R. I.; SOMIARI, S.; RUSSELL, S.; SHRIVER, C. D. Proteomics of breast carcinoma. **Journal of Chromatography B**. v. 815, p. 215-225, 2005.

SOMIARI, R. I.; SULLIVAN, A.; RUSSELL, S.; SOMIARI, S.; HU, H.; JORDAN, R.; GEORGE, A.; KATENHUSEN, R.; BUCHOWIECKA, A.; ARCIERO, C.; BRZESKI, H.; HOOKE, J.; SHRIVER, C. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 1863-1873, 2003.

SOTIRIOU, C. & PICCART, M. J. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 545-553, 2007.

STONELEY, M. & WILLIS, A. E. eIF4A1 is a promising new therapeutic target in ER-negative breast cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, p. 524-525, 2015.

SUN, B.; ZHANG, S.; ZHANG, D.; LI, Y.; ZHAO, X.; LUO, Y.; GUO, Y. Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 21, p. 7050-7059, 2008.

SUN, W.; XING, B.; SUN, Y.; DU, X.; LU, M.; HAO, C.; LU, Z.; MI, W.; WU, S.; WEI, H.; GAO, X.; ZHU, Y.; JIANG, Y.; QIAN, X.; HE, F. Proteome Analysis of Hepatocellular Carcinoma by Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis - Novel Protein Markers In Hepatocellular Carcinoma Tissues. **Molecular & Cellular Proteomic**, v. 6, p. 1798-1808, 2007.

SUTTON, C. W.; RUSTOGI, N.; GURKAN, C.; SCALLY, A.; LOIZIDOU, M. A.; Hadjisavvas, A.; Kyriacou, K. Quantitative proteomic profiling of matched normal and tumor breast tissues. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 8, p. 3891-3902, 2010.

TAN, A. A.; MU, A. K.; KIEW, L. V.; CHEN, Y. Comparative secretomic and N-glycoproteomic profiling in human MCF-7 breast cancer and HMEpC normal epithelial cell lines using a gel-based strategy. **Cancer Cell Int.**, v. 14, n. 1, p. 120, 2014.

THOMAS, L. R.; WANG, Q.; GRIEB, B. C.; PHAN, J.; FOSHAGE, A. M.; SUN, Q.; OLEJNICZAK, E. T.; CLARK, T.; DEY, S.; LOREY, S.; ALICIE, B.; HOWARD, G. C.; CAWTHON, B.; ESS, K. C.; EISCHEN, C. M.; ZHAO, Z.; FESIK, S. W.; TANSEY, W. P. Interaction with WDR5 Promotes Target Gene Recognition and Tumorigenesis by MYC. **Mol. Cell.**, v. 58, n. 3, p. 440-452, 2015.

THONGWATCHARA, P.; PROMWIKORN, W.; SRISOMSAP, C.; CHOKCHAICHAMNANKIT, D.; BOONYAPHIPHAT, P.; THONGSUKSAI, P. Differential protein expression in primary breast cancer and matched axillary node metastasis. **Oncol. Rep.**, v. 26, p. 185-191, 2011.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIÈRE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; LE BOURHIS, X. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, p. 1239-1247, 2007.

TOMSON, B. N. & ARNDT, K. M. The many roles of the conserved eukaryotic Paf1 complex in regulating transcription, histone modifications, and disease states. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1829, n. 1, p. 116-126, 2013.

TRAUB, F.; JOST, M.; HESS, R.; SCHORN, K.; MENZEL, C.; BUDDE, P.; SCHULZ-KNAPPE, P.; LAMPING, N.; PICH, A.; KREIPE, H.; TAMMEN, H. Peptidomic

analysis of breast cancer reveals a putative surrogate marker for estrogen receptor-negative carcinomas. **Lab. Invest.**, v. 86, n. 3, p. 246-253, 2006.

TSAI, C. L.; TSAI, C. N.; LIN, C. Y.; CHEN, H. W.; LEE, Y. S.; CHAO, A.; WANG, T. H.; WANG, H. S.; LAI, C. H. Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells. **Cell Rep.**, v. 2, n. 2, p. 283-293, 2012.

TURTOI, A.; DUMONT, B.; GREFFE, Y.; BLOMME, A.; MAZZUCHELLI, G.; DELVENNE, P.; MUTIJIMA, E. N.; LIFRANGE, E.; DE PAUW, E.; CASTRONOVO, V. Novel comprehensive approach for accessible biomarker identification and absolute quantification from precious human tissues. **J. Proteome Res.**, v. 10, n. 7, p. 3160-3182, 2011.

UMAR, A.; KANG, H.; TIMMERMANS, A. M.; LOOK, M. P.; MEIJER-VAN GELDER, M. E.; DEN BAKKER, M. A.; JAITLY, N.; MARTENS, J. W.; LUIDER, T. M.; FOEKENS, J. A.; PASA-TOLIĆ, L. Identification of a putative protein profile associated with tamoxifen therapy resistance in breast cancer. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 1278-1294, 2009.

VAN CAMPENHOUT, A.; VAN CAMPENHOUT, C. M.; LAGROU, A. R.; MANUEL-Y-KEENOY, B. Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus. **Free Radic. Res.**, v. 37, n. 10, p. 1069-1077, 2003.

VIEIRA, D. S. C.; DUFLOTH, R. M.; SCHMITT, F. C. L.; ZEFERINO, L. C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008.

WALSH, N.; LARKIN, A.; SWAN, N.; CONLON, K.; DOWLING, P.; McDERMOTT, K.; CLYNES, M. RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation. **Cancer Letters**, v. 306, p. 180-189, 2011.

WALSH, N.; O'DONOVAN, N.; KENNEDY, S.; HENRY, M.; MELEADY, P.; CLYNES, M.; DOWLING, P. Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis. **Proteome Sci.**, v. 7, n. 3, 2009.

WANG, T. H.; CHAO, A.; TSAI, C. L.; CHANG, C. L.; CHEN, S. H.; LEE, Y. S.; CHEN, J. K.; LIN, Y. J.; CHANG, P. Y.; WANG, C. J.; CHAO, A. S.; CHANG, S. D.; CHANG, T. C.; LAI, C. H.; WANG, H. S. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 9, n. 9, 1873-1884, 2010.

WARMOES, M.; JASPERS, J. E.; PHAM, T. V.; PIERSMA, S. R.; OUDGENOEG, G.; MASSINK, M. P.; WAISFISZ, Q.; ROTTENBERG, S.; BOVEN, E.; JONKERS, J.; JIMENEZ, C. R. Proteomics of mouse BRCA1-deficient mammary tumors identifies DNA repair proteins with potential diagnostic and prognostic value in human breast cancer. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 11, n. 7, M111.013334, 2012.

WEGELE, H.; HASLBECK, M.; REINSTEIN, J.; BUCHNER, J. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 25970–25976, 2003.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, p. 245-262, 2010.

WEITZEL, L. R.; BYERS, T.; ALLEN, J.; FINLAYSON, C.; HELMKE, S. M.; HOKANSON, J. E.; HUNSUCKER, S. W.; MURPHY, J. R.; NEWELL, K.; QUEENSLAND, K. M.; SINGH, M.; WISCHMEYER, P. E.; DUNCAN, M. W.; ELIAS, A. Discovery and verification of protein differences between Er positive/Her2/neu negative breast tumor tissue and matched adjacent normal breast tissue. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 124, n. 2, p. 297-305, 2010.

WESTERMEIER, R. Sensitive, Quantitative, and Fast Modifications for Coomassie Blue Staining of Polyacrylamide Gels. **Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 61-64, 2006.

WHELAN, S. A.; LU, M.; HE, J.; YAN, W.; SAXTON, R. E.; FAULL, K. F.; WHITELEGGE, J. P.; CHANG, H. R. Mass spectrometry (LC-MS/MS) site-mapping of N-glycosylated membrane proteins for breast cancer biomarkers. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 8, p. 4151-4160, 2009.

WILKINSON, B. & GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1699, n.1-2, p. 35-44, 2004.

WILLMER, T.; CONTU, L.; BLATCH, G. L.; EDKINS, A. L. Knockdown of Hop downregulates RhoC expression, and decreases pseudopodia formation and migration in cancer cell lines. **Cancer Lett.**, v. 328, n. 2, p. 252-260, 2013.

WITKE, W.; LI, W.; KWIATKWOSKI, D. J.; SOUTHWICK, F. S. Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. **J. Cell. Biol.**, v. 154, p. 775-784, 2001.

WON, K. A.; SCHUMACHER, R. J.; FARR, G. W.; HORWICH, A. L.; REED, S. I. Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 7584-7589, 1998.

WONSEY, D. R.; ZELLER, K. I.; DANG, C. V. The c-Myc target gene PRDX3 is required mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 6649-6654, 2002.

WU, C. C. & MacCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Curr. Opin. Mol. Ther.**, v. 4, n. 3, p. 242-250, 2002.

WULFKUHLE, J. D.; SGROI, D. C.; KRUTZSCH, H.; MCLEAN, K.; MCGARVEY, K.; KNOWLTON, M.; CHEN, S.; SHU, H.; SAHIN, A.; KUREK, R.; WALLWIENER, D.; MERINO, M. J.; PETRICOIN, E. F. 3<sup>RD</sup>; ZHAO, Y.; STEEG, P. S. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. **Cancer Res.**, v. 62, n. 22, p. 6740-6749, 2002.

WULFKUHLE, J. D.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews – Cancer**, v. 3, p. 267-275, 2003.

XIA, D.; ESSER, L.; TANG, W. K.; ZHOU, F.; ZHOU, Y.; YU, L.; YU, C. A. Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1827, n. 11-12, p. 1278-1294, 2013.

XIA, M.; SHERLOCK, J.; HEGERICH, P.; YOU, X.; LEE, K.; WALWORTH, C.; SPIER, E. **DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data**. IMECS – Hong Kong, 2010.

YAMAGUCHI, H. & CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1773, p. 642–652, 2007.

YEN, T. Y.; HASTE, N.; TIMPE, L. C.; LITSAKOS-CHEUNG, C.; YEN, R.; MACHER, B. A. Using a cell line breast cancer progression system to identify biomarker candidates. **J. Proteomics**, v. 16, n. 96, p. 173-183, 2014.

ZAKHARCHENKO, O.; GREENWOOD, C.; LEWANDOWSKA, A.; HELLMAN, U.; ALLDRIDGE, L.; SOUCHELNYTSKYI, S. Meta-data analysis as a strategy to evaluate individual and common features of proteome changes in breast cancer. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 7, p. 3-16, 2010.

ZHANG, B. Rho GDP dissociation inhibitors as potential targets for anticancer treatment. **Drug. Resist. Updat.**, v. 9, n. 3, p. 134-141, 2006.



ZHANG, B.; ZHANG, Y.; DAGHER, M. C.; SHACTER, E. Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v. 65, n. 14, p. 6054-6062, 2005a.

ZHANG, D.; TAI, L. K.; WONG, L. L.; CHIU, L. L.; SETHI, S. K.; KOAY, E. S. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 4, n. 11, p. 1686-1696, 2005b.

ZHANG, D.; TAI, L. K.; WONG, L. L.; PUTTI, T. C.; SETHI, S. K.; THE, M.; KOAY, E. S. Proteomic characterization of differentially expressed proteins in breast cancer: Expression of hnRNP H1, RKIP and GRP78 is strongly associated with HER-2/neu status. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 2, n. 1, p. 99-107, 2008.

ZHANG, D. H.; TAI, L. K.; WONG, L. L.; SETHI, S. K.; KOAY, E. S. Proteomics of breast cancer: enhanced expression of cytokeratin19 in human epidermal growth factor receptor type 2 positive breast tumors. **Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1797-1805, 2005c.

ZHENG, J.; RUDRA-GANGULY, N.; POWELL, W. C.; ROY-BURMAN, P. Suppression of prostate carcinoma cell invasion by expression of antisense L-plastin gene. **Am. J. Pathol.**, v. 155, p. 115-122, 1999.

ZHU, S.; SI, M. L.; WU, H.; MO, Y. Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 19, p. 14328-14336, 2007.

## APÊNDICE 1: Classificação funcional das proteínas identificadas

Função biológica das proteínas identificadas ao menos em duas amostras.

Amostra	Banda	Proteína	Função biológica
Em todas as amostras	1*	TRFE	Proteínas com função de ligação
	2*	TRFE	Proteínas com função de ligação
	3*	FIBB	Proteínas com função de ligação
	4*	FIBB	Proteínas com função de ligação
	5	IPYR	Enzimas metabólicas
	6	TPM4	Citoesqueleto e proteínas associadas
	7	TPM3	Citoesqueleto e proteínas associadas
Ao menos em 4 amostras	8*	TRFE	Proteínas com função de ligação
	9	CALR	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	10	PDIA6	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	11	ATPB	Enzimas metabólicas
	12	TPM1	Citoesqueleto e proteínas associadas
	13	PSME1	Regulação da proteólise
	14	1433G	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	15	GDIR1	Reguladores de proliferação e crescimento celular
Ao menos em 3 amostras	17	PDIA3	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	18	ENOG	Enzimas metabólicas
	19	QCR1	Enzimas metabólicas
	20	SEC13	Outras funções
	21	1433E	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	22	PSA3	Regulação da proteólise
	23	1433E 1433Z	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	24	PSA5	Regulação da proteólise
	25	GDIR2	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	26	PRDX3	Detoxificação e proteínas redox
Ao menos em 2 amostras	27	PLSL	Proteínas com função de ligação
	28	TCPE	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	29	TBA1B	Citoesqueleto e proteínas associadas
	30	A1AT	Proteínas com função de ligação
	31	ARP3	Citoesqueleto e proteínas associadas
	32	IF4A1 HNRPF	Proteínas com função de ligação
	33*	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	34	CAPG	Citoesqueleto e proteínas associadas
	35	CAPG	Citoesqueleto e proteínas associadas
	36*	HPT	Proteínas com função de ligação
	37	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	38	PDIA3	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	39	WDR61	Outras funções
	40	PSME2	Regulação da proteólise
	41	CASPE	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	42	1433Z	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	43	HSPB1	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>

Função Biológica das proteínas identificadas somente em CP 622.

<b>Amostra</b>	<b>Banda</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função biológica</b>
Somente na amostra CP622	44*	TRFE	Proteínas com função de ligação
	45	AMPL	Regulação da proteólise
	46	SBP1	Proteínas com função de ligação
	47	SBP1	Proteínas com função de ligação
	48*	SEPT2	Citoesqueleto e proteínas associadas
	49	AK1A1	Enzimas metabólicas
	50*	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	51	ABHEB	Enzimas metabólicas
	52*	APT	Enzimas metabólicas

Função biológica das proteínas identificadas somente em CP 633

Amostra	Banda	Proteína	Função biológica
Somente na amostra CP633	53*	ANXA6	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
		ALBU	Proteínas com função de ligação
	54	STIP1	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	55	CH60	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	56	PDIA3	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	57	K2C7	Citoesqueleto e proteínas associadas
		ACTB/G	Citoesqueleto e proteínas associadas
	58	TYPH	Enzimas metabólicas
	59	AMPL	Regulação da proteólise
	60	A1AT	Proteínas com função de ligação
	61	FIBG	Proteínas com função de ligação
	62	ENOA	Enzimas metabólicas
	63	GDIB	Outras funções
	64	EFTU	Biossíntese proteica
	65	BPNT1	Enzimas metabólicas
	66	STRAP	Outras funções
	67	TBB5	Citoesqueleto e proteínas associadas
	68	PGPS1	Enzimas metabólicas
	69*	SNAA	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	70	CAZA1	Citoesqueleto e proteínas associadas
	71	SNAA	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	72	ANXA3	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	73	ANXA4	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	74	ECH1	Enzimas metabólicas
	75	CLIC1	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	76	CATB	Citoesqueleto e proteínas associadas
	77	CAPZB	Citoesqueleto e proteínas associadas
	78	PNPH	Enzimas metabólicas
	79	CASPE	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	80	ACTB/G	Citoesqueleto e proteínas associadas
	81	PRDX4	Detoxificação e proteínas redox
		GSTP1	Detoxificação e proteínas redox
	82*	HNRPF	Proteínas com função de ligação
	83	GSTP1	Detoxificação e proteínas redox
	84*	PRDX2	Detoxificação e proteínas redox
	85	APT	Enzimas metabólicas
	86	NDKA	Biossíntese de nucleotídeos
	87	ARPC5	Citoesqueleto e proteínas associadas
	88	ACTB/G	Citoesqueleto e proteínas associadas
89	COX5A	Enzimas metabólicas	

Função biológica das proteínas identificadas somente em CP 645

Amostra	Banda	Proteína	Função biológica
Somente na amostra CP645	90	GDIA	Outras funções
	91	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
		FIBG	Proteínas com função de ligação
	92	K2C8	Citoesqueleto e proteínas associadas
	93	A1AT	Proteínas com função de ligação
		VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	94	A1AT	Proteínas com função de ligação
		VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	95	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	96	ACL6A	Citoesqueleto e proteínas associadas
	97	NDRG1	Outras funções
	98*	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	99	NDRG1	Outras funções
	100	H6ST1	Enzimas metabólicas
		NPM	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	101	NPM	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	102	TPM4	Citoesqueleto e proteínas associadas
	103	TPM1	Citoesqueleto e proteínas associadas
	104	1433T	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	105*	LAC2	Proteínas com atividade extracelular
IGKC		Proteins with extracellular activity	
106	PSD10	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>	
107	GGCT	Enzimas metabólicas	

Função biológica das proteínas identificadas somente em CP 655.

Amostra	Banda	Proteína	Função biológica
	108	CH60	Chaperonas moleculares / proteínas <i>heat shock</i>
	109*	TBA1C TBA1B TBA1A	Citoesqueleto e proteínas associadas
	110	VATB2	Enzimas metabólicas
	111	K1C9	Citoesqueleto e proteínas associadas
	112	TBB5	Citoesqueleto e proteínas associadas
	113	ACTB/G	Citoesqueleto e proteínas associadas
	114	RSSA	Biossíntese proteica
	115	ERLN2	Regulação da proteólise
	116	EIF3I	Biossíntese proteica
	117	VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	118	TBB5	Citoesqueleto e proteínas associadas
	119	K1C19 VIME	Citoesqueleto e proteínas associadas
	120	EIF3I	Biossíntese proteica
	121	ACTB/G	Citoesqueleto e proteínas associadas
	122	CAZA2	Citoesqueleto e proteínas associadas
	123	ANXA4	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	124	CATD	Regulação da proteólise
	125	RSSA	Biossíntese proteica
	126	IMPA1	Enzimas metabólicas
	127	PGAM1	Enzimas metabólicas
	128	PHB	Reguladores de proliferação e crescimento celular
	129	PRDX4	Detoxificação e proteínas redox
	130	GSTM3	Detoxificação e proteínas redox
	131	K2C8	Citoesqueleto e proteínas associadas
	132	PRDX2	Detoxificação e proteínas redox
	133*	HPTR	Proteínas com função de ligação

Only at sample CP655

Função biológica das proteínas identificadas somente em CP 655.

Amostra	Banda	Proteína	Função biológica
	134*	A1BG	Outras funções
	135*	K1C14	Citoesqueleto e proteínas associadas
	136*	FETUA	Outras funções
	137*	FETUA	Outras funções
	138*	FETUA	Outras funções
	139*	ALBU	Proteínas com função de ligação
		APOH	Proteínas com função de ligação
	140*	ALBU	Proteínas com função de ligação
		FIBB	Proteínas com função de ligação
		ALBU	Proteínas com função de ligação
	141*	LMNA	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	142	RSSA	Biossíntese proteica
	143*	ZN224	Outras funções
	144	K1C19	Citoesqueleto e proteínas associadas
	145	K2C8	Citoesqueleto e proteínas associadas
	146	K1C19	Citoesqueleto e proteínas associadas
	147	K2C8	Citoesqueleto e proteínas associadas
	148	TBB5	Citoesqueleto e proteínas associadas
	149	GLOD4	Outras funções
	150	CLIC1	Proteínas associadas à membrana com múltiplas atividades
	151	CATD	Regulação da proteólise
	152	PRDX4	Detoxificação e proteínas redox
	153*	GSTM2	Detoxificação e proteínas redox
	154	COMT	Outras funções
	155*	APOA1	Proteínas com função de ligação
	156*	APOA1	Proteínas com função de ligação
	157	LGUL	Enzimas metabólicas
	158	K2C1	Citoesqueleto e proteínas associadas
	159	NDKA	Biossíntese de nucleotídeos
	160*	HPT	Proteínas com função de ligação
	161*	A1AT	Proteínas com função de ligação

Only at sample CP672

## APÊNDICE 2: Dados de identificação proteica

Dados da identificação das proteínas observadas em ao menos duas amostras.

Amostra	Banda	Proteína	Score / 2º Score	MW (kDa)/ pI teóricas	MW / pI observadas	$\Delta$ MW / $\Delta$ pI	cobertura %	Pp procurado / Pp encontrado	erro (ppm)
Em todas as amostras	1*	TRFE	133 / 29	77.064 / 6.81	81.0 / 6.5	5.1% / 0.31	18%	12 / 19	100
	2*	TRFE	99 / 33	77.064 / 6.81	85.0 / 6.75	10.3% / 0.06	25%	15 / 25	100
	3*	FIBB	120 / 42	56.577 / 8.54	42.0 / 5.72	25.7% / 2.82	24%	10 / 13	100
	4*	FIBB	164 / 46	56.577 / 8.54	42.0 / 6.04	25.7% / 2.5	35%	18 / 23	100
	5	IPYR	181 / 42	33.095 / 5.54	36.0 / 5.63	8.8% / 0.09	47%	10 / 11	70
	6	TPM4	79 / 32	28.619 / 4.67	33.0 / 4.56	15.3% / 0.11	16%	6 / 10	70
	7	TPM3	100 / 38	32.987 / 4.68	33.0 / 4.72	0.03% / 0.04	24%	9 / 18	100
Ao menos em 4 amostras	8*	TRFE	279 / 30	77.064 / 6.81	86.0 / 6.67	11.6% / 0.14	38%	24 / 33	50
	9	CALR	78 / 37	48.283 / 4.29	67.0 / 4.20	38.7% / 0.09	15%	5 / 7	50
	10	PDIA6	201 / 40	48.490 / 4.95	50.0 / 5.12	3.1% / 0.17	43%	14 / 20	90
	11	ATPB	155 / 38	56.525 / 5.26	53.0 / 5.09	6.2% / 0.17	41%	23 / 40	100
	12	TPM1	138 / 54	32.709 / 4.69	35.0 / 4.69	7% / 0	37%	14 / 35	100
	13	PSME1	143 / 32	28.876 / 5.78	31.0 / 5.9	7.3% / 0.12	52%	13 / 25	100
	14	1433G	86 / 36	28.456 / 4.80	31.0 / 4.65	8.9% / 0.15	34%	8 / 13	155
	15	GDIR1	120 / 32	23.250 / 5.02	27.0 / 5.07	16.1% / 0.05	37%	10 / 18	30
Ao menos em 3 amostras	16	PARK7	115 / 28	20.050 / 6.33	26.0 / 6.33	29.6% / 0	68%	9 / 20	55
	17	PDIA3	165 / 34	56.782 / 5.98	59.0 / 5.94	3.9% / 0.04	35%	15 / 23	100
	18	ENOG	222 / 31	47.581 / 4.91	51.0 / 4.94	7.2% / 0.03	62%	19 / 32	100
	19	QCR1	195 / 32	53.297 / 5.94	49.0 / 5.74	8% / 0.20	37%	13 / 16	100
	20	SEC13	71 / 25	36.031 / 5.22	40.0 / 5.19	11% / 0.03	23%	5 / 9	110
	21	1433E	123 / 31	29.326 / 4.63	32.0 / 4.60	9.1% / 0.03	40%	12 / 22	100
	22	PSA3	110 / 28	28.643 / 5.19	31.0 / 5.21	8.2% / 0.03	27%	8 / 11	50
	23	1433E 1433Z	173 / 74	28.179 / 4.76	30.0 / 4.75	6.4% / 0.01	52%	15 / 23	100
	24	PSA5	88 / 35	26.565 / 4.74	28.0 / 4.58	5.4% / 0.16	43%	7 / 15	70
	25	GDIR2	83 / 40	23.031 / 5.10	27.0 / 5.20	17.2% / 0.10	29%	6 / 12	80
Ao menos em 2 amostras	26	PRDX3	60 / 39	28.017 / 7.67	28.0 / 6.35	0.06% / 1.32	15%	4 / 7	80
	27	PLSL	142 / 22	70.814 / 5.29	71.0 / 5.32	0.3% / 0.03	37%	19 / 37	100
	28	TCPE	195 / 51	59.671 / 5.45	63.0 / 5.66	5.6% / 0.21	50%	30 / 53	100
	29	TBA1B	126 / 30	50.152 / 4.94	59.0 / 5.18	17.6% / 0.24	40%	15 / 42	100
	30	A1AT	223 / 30	46.878 / 5.37	56.0 / 4.83	19.4% / 0.54	46%	18 / 29	100
	31	ARP3	219 / 34	47.797 / 5.61	53.0 / 5.87	10.9% / 0.26	46%	17 / 25	100
	32	IF4A1 HNRPF	146 / 46 (Mistura)	46.353 / 5.32 45.985 / 5.38	49.0 / 5.47	5.7% / 0.15 6.5% / 0.09	36% 26%	14 / 32 8 / 32	100
	33*	VIME	68 / 34	53.676 / 5.06	45.0 / 4.63	16.1% / 0.43	12%	6 / 7	140
	34	CAPG	75 / 35	38.760 / 5.82	43.0 / 6.17	10.9% / 0.35	33%	8 / 20	100
	35	CAPG	70 / 30	38.760 / 5.82	43.0 / 6.23	10.9% / 0.41	26%	6 / 21	100
	36*	HPT	87 / 27	42.205 / 6.13	43.0 / 5.48	1.9% / 0.65	19%	8 / 13	100
	37	VIME	141 / 24	53.676 / 5.06	43.0 / 4.77	19.9% / 0.29	28%	13 / 17	40
	38	PDIA3	64 / 27	57.146 / 5.98	42.0 / 5.69	26.% / 0.29	9%	7 / 11	50
	39	WDR61	96 / 37	33.731 / 5.16	35.0 / 5.10	3.7% / 0.06	37%	7 / 18	70
	40	PSME2	172 / 38	27.555 / 5.54	32.0 / 5.52	16.1% / 0.02	49%	11 / 15	100
	41	CASPE	144 / 38	27.947 / 5.44	31.0 / 5.51	10.9% / 0.07	57%	15 / 34	100
	42	1433Z	119 / 31	27.745 / 4.73	30.0 / 4.70	8.1% / 0.03	46%	12 / 28	100
	43	HSPB1	93 / 31	22.826 / 5.98	29.0 / 5.96	27% / 0.02	25%	6 / 17	60



Dados da identificação das proteínas observadas somente em CP 622.

Amostra	Banda	Proteína	Score / 2º Score	MW (kDa) / pI teóricas	MW / pI observadas	$\Delta$ MW / $\Delta$ pI	cobertura %	Pp procurado / Pp encontrado	erro (ppm)
Somente na amostra CP622	44*	TRFE	MS/MS	77.064 / 6.81	83.0 / 6.77	7.7% / 0.04	-	-	-
	45	AMPL	156 / 36	56.530 / 8.03	57.0 / 6.89	0.8% / 1.14	33%	27/15	100
	46	SBP1	77 / 31	52.928 / 5.93	56.0 / 6.20	5.8% / 0.27	22%	8 / 19	180
	47	SBP1	207 / 41	52.928 / 5.93	56.0 / 6.33	5.8% / 0.40	38%	22 / 15	85
	48*	SEPT2	84 / 54	41.689 / 6.15	44.0 / 6.59	5.5% / 0.44	23%	5 / 5	130
	49	AK1A1	111 / 23	36.892 / 6.32	41.0 / 6.89	11.1% / 0.57	26%	7 / 9	90
	50*	VIME	200 / 49	53.676 / 5.06	41.0 / 4.68	23.6% / 0.38	53%	20 / 33	80
	51	ABHEB	90 / 40	22.446 / 5.94	26.0 / 6.16	15.8% / 0.22	33%	5 / 6	140
	52*	APT	73 / 26	19.766 / 5.78	23.0 / 5.14	16.3% / 0.64	37%	5 / 12	200

## Dados da identificação das proteínas observadas somente em CP 633.

Amostra	Banda	Proteína	Score / 2º Score	MW (kDa) / pi teóricas	MW / pi observadas	$\Delta$ MW / $\Delta$ pi	cobertura %	Pp procurado / Pp encontrado	erro (ppm)
Somente na amostra CP633	53*	ANXA6	225	76.168 / 5.42	73.0 / 5.57	4.1% / 0.15	28%	15 / 32	50
		ALBU	(Mistura)	71.317 / 5.92		2.3% / 0.35	23%	12 / 32	
	54	STIP1	104 / 29	63.227 / 6.40	65.0 / 6.76	2.8% / 0.36	20%	9 / 14	100
	55	CH60	141 / 37	61.187 / 5.70	62.0 / 5.32	1.3% / 0.38	34%	11 / 16	160
	56	PDIA3	115 / 33	57.146 / 5.98	58.0 / 5.74	1.5% / 0.24	26%	11 / 24	100
	57	K2C7	77 / 27	51.411 / 5.40	56.0 / 5.44	8.9% / 0.04	18%	6 / 11	75
	58	ACTB/G	109	42.052 / 5.29	56.0 / 5.33	33.1% / 0.04	37%	8 / 29	100
		TYPH	(Mistura)	50.323 / 5.36		11.2% / 0.02	24%	8 / 29	
	59	AMPL	224 / 37	56.530 / 8.03	55.0 / 6.77	2.7% / 1.26	40%	18 / 22	170
	60	A1AT	162 / 38	46.878 / 5.37	55.0 / 4.67	17.3% / 0.7	32%	11 / 17	75
	61	FIBG	115 / 35	52.106 / 5.37	53.0 / 5.79	1.7% / 0.42	37%	10 / 27	85
	62	ENOA	139 / 27	47.481 / 7.01	50.0 / 6.84	5.3% / 0.17	46%	14 / 30	80
	63	GDIB	155 / 36	51.087 / 6.11	49.0 / 6.34	4.1% / 0.23	37%	12 / 17	95
	64	EFTU	131 / 38	49.852 / 7.26	46.0 / 6.84	7.7% / 0.42	28%	10 / 14	80
	65	BPNT1	88 / 30	33.713 / 5.46	44.0 / 5.68	30.5% / 0.22	27%	7 / 12	50
	66	STRAP	86 / 40	38.756 / 4.98	41.0 / 5.03	5.8% / 0.05	22%	5 / 6	50
	67	TBB5	127 / 104	50.095 / 4.78	40.0 / 5.05	20.1% / 0.27	22%	10 / 13	50
	68	PGPS1	57 / 22	63.147 / 9.08	41.0 / 6.77	35% / 2.31	14%	5 / 13	100
	69*	SNAA	68 / 33	33.667 / 5.23	39.0 / 6.04	15.8% / 0.81	21%	4 / 4	180
	70	CAZA1	65 / 32	33.073 / 5.45	38.0 / 5.53	14.9% / 0.08	23%	5 / 16	100
	71	SNAA	60 / 34	33.667 / 5.23	37.0 / 5.24	9.9% / 0.01	15%	4 / 6	100
	72	ANXA3	109 / 25	36.524 / 5.63	34.0 / 5.71	6.9% / 0.08	36%	9 / 15	200
	73	ANXA4	103 / 40	36.088 / 5.84	34.0 / 5.84	5.8% / 0	28%	9 / 12	160
	74	ECH1	84 / 42	36.136 / 8.16	34.0 / 6.37	5.9% / 1.79	27%	6 / 14	100
	75	CLIC1	177 / 39	27.248 / 5.09	33.0 / 5.18	21.1% / 0.09	58%	10 / 19	60
	76	CATB	84 / 30	38.766 / 5.88	33.0 / 5.27	14.8% / 0.61	28%	7 / 14	55
	77	CAPZB	118 / 32	31.616 / 5.36	32.0 / 5.75	1.2% / 0.39	32%	10 / 20	185
	78	PNPH	133 / 34	32.325 / 6.45	31.0 / 6.69	4.1% / 0.24	41%	8 / 11	90
	79	CASPE	86 / 37	27.947 / 5.44	31.0 / 5.39	10.9% / 0.05	34%	7 / 21	100
	80	ACTB/G	115 / 31	42.052 / 5.29	29.0 / 5.50	31% / 0.21	37%	10 / 18	60
	81	PRDX4	170 / 40	30.749 / 5.86	29.0 / 5.77	5.7% / 0.09	50%	10 / 19	60
	82*	GSTP1	89 (Mistura)	23.569 / 5.43	27.0 / 5.34	14.5% / 0.09	31%	4 / 8	30
		HNRPF		45.985 / 5.38		41.3% / 0.04	12%	4 / 8	
83	GSTP1	97 / 36	23.569 / 5.43	26.0 / 5.64	10.3% / 0.21	51%	8 / 25	85	
84*	PRDX2	115 / 27	22.049 / 5.66	25.0 / 5.61	13.4% / 0.05	34%	6 / 7	90	
85	APT	92 / 36	19.766 / 5.78	23.0 / 5.54	16.3% / 0.24	41%	5 / 7	85	
86	NDKA	120 / 45	17.309 / 5.83	21.0 / 5.95	21.3% / 0.12	67%	9 / 17	170	
87	ARPC5	86 / 24	16.367 / 5.47	18.0 / 5.66	9.9% / 0.19	43%	5 / 8	120	
88	ACTB/G	58 / 24	42.052 / 5.29	18.0 / 5.04	57.2% / 0.25	20%	5 / 14	180	
89	COX5A	75 / 29	16.923 / 6.30	15.0 / 4.86	11.3% / 1.44	32%	5 / 10	150	

## Dados da identificação das proteínas observadas somente em CP 645.

Amostra	Banda	Proteína	Score / 2º Score	MW (kDa) / pI teóricas	MW / pI observadas	$\Delta$ MW / $\Delta$ pI	cobertura %	Pp procurado / Pp encontrado	erro (ppm)
Somente na amostra CP645	90	GDIA	189 / 39	51.177 / 5.0	64.0 / 5.08	25% / 0.08	54%	17 / 26	100
	91	VIME	173 / 51	53.676 / 5.06	57.0 / 5.22	6.2% / 0.16	36%	19 / 34	100
		FIBG	(Mistura)	52.106 / 5.37		9.4% / 0.15	18%	6 / 34	
	92	K2C8	69 / 30	53.671 / 5.52	56.0 / 5.51	4.3% / 0.01	18%	9 / 22	100
	93	A1AT	178 / 49	46.878 / 5.37	54.0 / 4.89	15.2% / 0.48	41%	13 / 29	100
		VIME	(Mistura)	53.676 / 5.06		0.6% / 0.17	22%	8 / 29	
	94	A1AT	236 / 57	46.878 / 5.37	53.0 / 5.02	13% / 0.35	44%	15 / 37	100
		VIME	(Mistura)	53.676 / 5.06		1.2% / 0.04	30%	12 / 37	
	95	VIME	224 / 37	53.676 / 5.06	53.0 / 4.93	1.2% / 0.13	41%	18 / 20	100
	96	ACL6A	67 / 28	47.944 / 5.39	50.0 / 5.53	4.2% / 0.14	19%	6 / 11	100
	97	NDRG1	87 / 42	43.264 / 5.49	49.0 / 5.76	13.2% / 0.27	24%	11 / 17	100
	98*	VIME	79 / 33	53.652 / 5.06	48.0 / 4.78	10.5% / 0.28	0,16	7 / 9	100
	99	NDRG1	65 / 23	43.264 / 5.49	48.0 / 5.89	10.9% / 0.40	20%	7 / 14	35
	100	H6ST1	62 / 23	48.879 / 9.04	40.0 / 4.80	18.1% / 4.24	22%	7 / 19	100
		NPM	59 / 23	32.726 / 4.64		22.2% / 0.16	24%	8 / 19	
	101	NPM	74 / 29	32.726 / 4.64	40.0 / 4.88	22.2% / 0.24	24%	8 / 26	100
	102	TPM4	84 / 30	28.619 / 4.67	40.0 / 4.67	39.7% / 0	31%	7 / 16	100
	103	TPM1	91 / 34	32.746 / 4.69	37.0 / 4.69	13% / 0	28%	8 / 16	100
	104	1433T	129 / 46	27.764 / 4.68	31.0 / 4.65	11.6% / 0.03	0,33	8 / 8	100
	105*	LAC2	73 / 56	11.458 / 6.92	30.0 / 5.99	161.8% / 0.93	39%	3 / 7	100
IGKC		(Mistura)	11.773 / 5.58	154.8% / 0.41		51%	3 / 7		
106	PSD10	63 / 31	24.697 / 5.71	27.0 / 5.94	9.3% / 0.23	25%	5 / 9	100	
107	GGCT	71 / 35	21.222 / 5.07	24.0 / 5.04	13% / 0.03	32%	5 / 8	30	

## Dados da identificação das proteínas observadas somente em CP 655.

Amostra	Banda	Proteína	Score / 2º Score	MW (kDa) / pI teóricas	MW / pI observadas	$\Delta$ MW / $\Delta$ pI	cobertura %	Pp procurado / Pp encontrado	erro (ppm)
Somente na amostra CP 655	108	CH60	116 / 49	61.187 / 5.70	62.0 / 5.42	1.3% / 0.28	26%	12 / 26	100
	109*	TBA1C TBA1B TBA1A	178 / -	50.548 / 4.96	59.0 / 5.08	16.7% / 0.12	31%	11 / 11	70
	110	VATB2	84 / 32	56.807 / 5.57	58.0 / 5.75	2.1% / 0.18	19%	7 / 15	70
	111	K1C9	98 / -	62.255 / 5.14	49.0 / 6.33	21.2% / 1.19	16%	6 / 6	80
	112	TBB5	124 / 44	50.095 / 4.78	49.0 / 5.63	2.2% / 0.85	19%	10 / 11	100
	113	ACTB/G	138 / 55	42.052 / 5.29	46.0 / 5.44	9.4% / 0.15	38%	10 / 20	30
	114	RSSA	117 / 35	32.947 / 4.79	44.0 / 4.81	33.5% / 0.02	30%	7 / 9	100
	115	ERLN2	122 / -	38.044 / 5.47	44.0 / 5.79	15.6% / 0.32	22%	8 / 10	100
	116	EIF3I	135 / 30	36.878 / 5.38	42.0 / 4.82	13.9% / 0.56	22%	9 / 10	100
	117	VIME	200 / 49	53.676 / 5.06	41.0 / 4.68	23.6% / 0.38	53%	20 / 33	80
	118	TBB5	132 / -	50.095 / 4.78	40.0 / 5.11	20.1% / 0.33	16%	9 / 9	50
	119	K1C19 VIME	219	44.079 / 5.04	39.0 / 4.74	11.5 / 0.30	36%	18 / 43	100
			(Mistura)	53.676 / 5.06		27.3% / 0.32	34%	13 / 43	
	120	EIF3I	135 / 30	36.878 / 5.38	39.0 / 5.71	5.7% / 0.33	22%	9 / 10	100
	121	ACTB/G	90 / 36	42.052 / 5.29	38.0 / 5.68	9.6% / 0.39	21%	7 / 9	85
	122	CAZA2	102 / 28	33.157 / 5.57	35.0 / 5.84	5.5% / 0.27	20%	6 / 7	100
	123	ANXA4	103 / 40	36.088 / 5.84	34.0 / 5.84	5.8% / 0	28%	9 / 12	160
	124	CATD	97 / 32	45.037 / 6.10	32.0 / 5.89	28.9% / 0.21	22%	8 / 9	85
	125	RSSA	169 / 34	32.947 / 4.79	31.0 / 6.24	5.9% / 1.45	38%	10 / 14	60
	126	IMPA1	139 / 36	30.568 / 5.16	31.0 / 5.17	1.4% / 0.01	37%	10 / 18	100
	127	PGAM1	119 / 38	28.900 / 6.67	30.0 / 6.93	3.8% / 0.26	38%	11 / 25	30
	128	PHB	240 / 35	29.843 / 5.57	30.0 / 5.71	0.5% / 0.14	76%	17 / 36	100
	129	PRDX4	111 / 38	30.749 / 5.86	29.0 / 5.89	5.7% / 0.03	35%	9 / 25	100
	130	GSTM3	156 / 34	26.998 / 5.37	29.0 / 5.39	7.4% / 0.02	42%	13 / 31	60
	131	K2C8	113 / 37	62.255 / 5.14	27.0 / 4.46	56.6% / 0.68	21%	8 / 14	50
	132	PRDX2	101 / 34	22.049 / 5.66	22.0 / 5.17	0.2% / 0.49	29%	6 / 12	70
	133*	HPTR	MS/MS	39.03 / 6.63	18.0 / 5.94	53.8% / 0.39	-	-	-

## Dados da identificação das proteínas observadas somente em CP 672.

Amostra	Banda	Proteína	Score / 2º Score	MW (kDa) / pI teóricas	MW / pI observadas	$\Delta$ MW / $\Delta$ pI	cobertura %	Pp procurado / Pp encontrado	erro (ppm)
	134*	A1BG	91 / 42	54.790 / 5.56	83.0 / 5.23	51.5% / 0.33	21%	7 / 21	70
	135*	K1C14	104 / 86 (K1C16)	51.872 / 5.09 (51.578 / 4.99)	62.0 / 4.40	19.5% / 0.69 (20.2% / 0.59)	29% (25%)	11 / 29 (9 / 29)	70
	136*	FETUA	83 / 31	40.098 / 5.43	61.0 / 4.45	52.1% / 0.98	20%	6 / 15	100
	137*	FETUA	119 / 39	40.098 / 5.43	60.0 / 4.51	49.6% / 0.92	23%	9 / 13	50
	138*	FETUA	122 / 40	40.098 / 5.43	60.0 / 4.57	49.6% / 0.86	23%	9 / 13	80
	139*	ALBU APOH	167 (Mistura)	71.317 / 5.92	59.0 / 6.85	17.3% / 0.93	27%	15 / 36	100
	140*	ALBU FIBB	290 (Mistura)	71.317 / 5.92	54.0 / 6.07	23.3% / 0.15	34%	17 / 26	100
	141*	ALBU LMNA	252 (Mistura)	71.317 / 5.92	47.0 / 5.78	34% / 0.14	29%	30 / 14	100
Somente na amostra CP 672	142	RSSA	163 / 34	32.947 / 4.79	43.0 / 4.73	30.5% / 0.06	41%	10 / 20	70
	143*	ZN224	68 / 44	84.906 / 9.01	41.0 / 5.28	51.7% / 3.73	14%	8 / 19	80
	144	K1C19	167 / 37	44.079 / 5.04	41.0 / 5.00	7% / 0.04	44%	16 / 33	80
	145	K2C8	114 / 56	53.671 / 5.52	39.0 / 4.93	27.3% / 0.59	36%	17 / 30	100
	146	K1C19	170 / 46	44.079 / 5.04	39.0 / 4.71	11.5% / 0.33	35%	14 / 24	100
	147	K2C8	104 / 43	53.671 / 5.52	41.0 / 4.91	23.6% / 0.61	23%	11 / 16	100
	148	TBB5	146 / 37	50.095 / 4.78	38.0 / 5.06	24.1% / 0.28	19%	13 / 17	70
	149	GLOD4	134 / 42	35.170 / 5.40	32.0 / 5.55	9% / 0.15	25%	10 / 14	50
	150	CLIC1	72 / 27	27.248 / 5.09	31.0 / 5.21	13.7% / 0.12	35%	5 / 16	70
	151	CATD	96 / 39	45.037 / 6.10	32.0 / 5.86	28.9% / 0.24	21%	9 / 14	80
	152	PRDX4	95 / 43	30.749 / 5.86	27.0 / 5.86	12.2% / 0	33%	6 / 10	100
	153*	GSTM2	101 / 43	25.899 / 6.00	28.0 / 6.52	8.1% / 0.52	38%	7 / 14	100
	154	COMT	76 / 36	30.474 / 5.26	26.0 / 5.07	14.7% / 0.19	36%	5 / 13	100
	155*	APOA1	81 / 40	30.759 / 5.56	27.0 / 5.29	12.2% / 0.27	23%	6 / 12	100
	156*	APOA1	96 / 54	30.759 / 5.56	27.0 / 5.40	12.2% / 0.16	31%	9 / 28	100
	157	LGUL	66 / 34	20.992 / 5.12	23.0 / 4.97	9.5% / 0.15	43%	4 / 8	80
	158	K2C1	95 / 37	66.170 / 8.15	23.0 / 5.63	65.2% / 2.52	19%	8 / 20	60
	159	NDKA	120 / 45	17.309 / 5.83	21.0 / 5.95	21.3% / 0.12	67%	9 / 17	170
	160*	HPT	73 / 43	45.861 / 6.13	21.0 / 5.92	54.2% / 0.21	17%	6 / 15	40
	161*	A1AT	105 / 51	46.878 / 5.37	53.0 / 5.14	13% / 0.23	30%	8 / 14	100

**APÊNDICE 3: Artigo**

Artigo submetido à revista *Cancer Genomics and Proteomics*

**Comparative proteomics of tumor and paired normal breast tissue highlights potential biomarkers in breast cancer**

Gustavo Góes da Costa<sup>1</sup>; Talita Helen Bombardelli Gomig<sup>1</sup>; Rodrigo Kaviski<sup>1</sup>; Karla Santos Sousa<sup>1</sup>; Caroline Kukolj<sup>2</sup>; Rubens Silveira De Lima<sup>3,4</sup>; Cicero De Andrade Urban<sup>3</sup>; Iglénir J Cavalli<sup>1</sup>; Enilze M S F Ribeiro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná; <sup>3</sup>Serviço de Cirurgia Oncológica, Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Brazil; <sup>4</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas, Curitiba, Brazil.

gustavocosta.bio@gmail.com, talitahbg@gmail.com, rkaviski21@gmail.com,  
kauback@yahoo.com.br, ckukolj@hotmail.com, rsilveiralima@uol.com.br,  
cicerourban@hotmail.com, cavalli@ufpr.br, eribeiro@ufpr.br.

Correspondence to: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Centro Politécnico Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética - Caixa Postal 19071, Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, CEP: 81531-990 - Curitiba/Paraná, Brazil. Tel: +55 4133611556, e-mail: eribeiro@ufpr.br

*Key words:* breast cancer, proteome, differential expression, biomarker

*Running Title:* Proteomics in Breast Cancer

*Submission date:* 06.09.2015

## Abstract

**Background:** Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide, and about 57,000 new cases are expected for the Brazilian population in 2015. Elucidation of protein expression and modification is essential for the biology understanding, early diagnosis and therapeutics of breast cancer. The main objectives of this study are the comparison between the proteome of tumor and non-tumor paired breast cancer tissue, describing all identified proteins, highlighting the most differentially expressed ones and comparing the data with current literature. **Material and Methods:** The five paired samples from patients with invasive ductal carcinoma were analyzed by 2DE and MS. **Results:** We obtained 161 identified spots corresponding to 110 distinct proteins. Forty-three differential spots were common to at least two samples, and the ten proteins with the highest fold changes were CASPE, ENOG, TPM1, CAPG, VIME, TPM3, TRFE, PDIA6, WDR61 and PDIA3. Metabolic enzymes and proteins with binding functions were the most representative functional classes of proteins with increased and decreased expression in tumor tissue respectively. **Conclusions:** Taking the fold change as a parameter, we point to future targets to be studied by functional methods in a search for good biomarkers in initiation and progress of breast cancer.

*Abbreviations:* 2DE: two-dimensional electrophoresis; MS: mass spectrometry; IDC: Invasive ductal carcinoma; MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization; TOF: time of flight; PMF: peptide mass fingerprinting; BCT: breast cancer tissue; NBT: non-tumor breast tissue; PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis; IEF: isoelectric focusing; pI: isoelectric point; MM: molecular mass; ER: estrogen receptor.

## Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide. Survival rates vary according world regions ranging from around 80% in North America, Sweden and Japan, 60% in middle-income countries and up to 40% in low-income countries(1). In Brazil, about 57,120 new cases are expected in 2015 (2). Despite all efforts to control the disease, incidence is still rising in most countries and it is expected to keep rising in the

next 20 years (3). Invasive ductal carcinoma (IDC) is the most representative (65-80%) breast cancer type (4).

Proteins are the major conductors of genetic information and the molecules that can better reflect the functional status of the cell. That is why the elucidation of protein expression and modification is essential in breast cancer biology understanding, also for cancer risk predictors, early diagnosis biomarkers and therapeutic targets identification (5). Proteomics, working together with genomics, might refine current breast cancer classifications and management protocols (6).

Despite the development of alternative techniques, two-dimensional electrophoresis (2DE) continues to be widely employed for differential expression studies, so the number of published articles using 2DE continues steadily high, confirming its status of central technique in Proteomics. By its high resolving power, 2D gels allow separation of different isoelectric point (pI) and molecular mass (MM) protein. Coupled with mass spectrometry (MS), 2DE remains the mature technology and perhaps gold-standard depending on the study goal (7,8). The MALDI-TOF/MS profiling techniques are commonly used to determine different markers and mechanisms involved in cancer development. MALDI-TOF/MS peptide mass fingerprinting (PMF) is a fast and cheap protein identification method (9). This method has been used in several recently published biomarker determination studies in breast cancer (10,11,12).

The main objective of this study is the comparison between the proteome of tumor and non-tumor breast cancer tissue, describing all identified proteins, highlighting the most differentially expressed ones and comparing the data with current literature.

## **Materials and Methods**

*Sample collection and clinical evaluation.* Matched pairs of sporadic breast cancer tissue (BCT) and non-tumor breast (NTB) tissue were obtained from five female patients (average age of  $58.6 \pm 12.3$ ) diagnosed with IDC without any neoadjuvant therapy. Samples were collected during surgical intervention at Hospital Nossa Senhora das Graças in Curitiba, Brazil, and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Non-tumor tissues were removed from the opposite quadrant of tumor area and then used after confirmation of normality by a pathologist. The study was approved by the Ethics Committee and patients signed an



informed consent to participate in this piece of research. Table I shows the patients' information.

*Protein extraction and quantification.* Tissue fragments were solubilized in lysis buffer containing 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 40mM Tris and 0.2% PMSF and the cells were homogenized by means of an electric tissue disruptor. The total lysate was centrifuged at 15,300g for 5min to clear debris. The protein concentration was determined by using the Bradford method (13).

*2D-PAGE.* This step was made as previously described (14). Briefly, 1mg total protein was solubilized in the rehydration buffer. Passive rehydration of 13cm linear IPG (immobilized pH gel) strips (pH 4-7) (GE Helthcare) occurred at room temperature (RT) for 16h. Isoelectric focusing (IEF) was performed according to the program suggested by the manufacturer. After IEF, strips were equilibrated for 15min with DTT and then for another 15min with iodoacetamide. SDS-PAGE was performed with 10% gels using Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare) at 11°C for 30min at 15mA and 4.5h at 30mA. Gels were fixed for 1h and stained with Coomassie G-250 for 16h. Gels were produced in triplicate for each sample. No depletion method was used for removing plasma proteins.

*Image Analysis.* Stained gels were scanned with ImageScanner™ II (GE Healthcare) and analyzed with ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare). The parameters used to detect spots by the software were: area min - 5; smooth - 3; and saliency - 25. Triplicates were cropped to frame the same cluster of spots across samples and one representative gel was used to create a match-set. Logarithmic ratios of spots with precise matching were considered for normalization at software analysis. Only spots with expression levels above 2 folds were considered for statistical analysis. The ImageMaster™ software was also used to perform Student's t-test to select differential spots ( $p < 0.05$ ).

*Mass Spectrometry and Protein Identification.* The spots were manually excised from the gels and were destained in 50% acetonitrile and 25mM ammonium bicarbonate. Dehydration was performed in two rounds of 100µl of acetonitrile for 5min. The supernatant was discarded and gels were dried at room temperature. Afterwards, the gel pieces were rehydrated in 20µl of solution containing 40mM ammonium bicarbonate, 10% acetonitrile and 15ng/µl trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) for 30 min on ice bath. The digestion occurred at 37°C for 16-20h. To improve tryptic peptides removal, supernatant was removed to a 0.5ml tube and

gel fragment was submerged in 20 $\mu$ l of trifluoroacetic acid (TFA) 5% and acetonitrile 50% solution for 30min under agitation. The supernatant was added to the same 0.5ml tube and submitted to SPD1010 Integrated SpeedVac™ (Thermo Scientific) for 30min (RT) for peptide concentration. Concentrated peptide extracts were dissolved (1:1) in a matrix solution (50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid and saturated  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and spotted onto scout MTP MALDI ion source 384 target (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, USA). Tryptic peptide masses were obtained from MALDI-TOF/TOF/MS/MS AutoflexII (Bruker Daltonics) in positive reflector mode; 20kV acceleration voltage; 150ns interval between the laser pulse and voltage application; and acquisition range of 800-3,200Da. External calibration was performed with a mix containing ACTH1-17; ACTH 1-24; ACTH 18-39; angiotensin I and II and somatostatin. Mass specters were analyzed through FlexControl 2.0 software (Bruker Daltonics) using trypsin autolysis picks (842.50 Da and 2211.10 Da) for internal calibration. The PMF and/or MS/MS data were compared with theoretical molecular masses and isoelectric point from UniProtKB/Swiss-Prot annotation, using the Matrix Science (MASCOT) database. For protein identification, the taxonomic category was restricted to Homo sapiens, maximum 200 ppm of mass tolerance and one missed enzymatic cleavage for trypsin. A number of fixed (carbamidomethylation of cysteine residues) and variable modifications (methionine oxidation) were included as search parameters. The threshold value for  $p < 0.05$  was 56.

## Results

### *Comparative analysis of breast cancer tissues and matched non-tumor breast tissue samples*

The paired samples obtained from five patients diagnosed with IDC were compared in order to observe individual differences in expression profile (Figure I). The 30 gels from non-tumor tissue showed a mean of  $630 \pm 100.6$  spots while the 30 ones from tumors presented a mean of  $970 \pm 285.9$  spots. The average of differentially spots detected and proteins identified in the five paired samples was 85.2 and 53.4 (62.7%), respectively. The results showed 161 identified spots corresponding to 110 distinct proteins: 33 spots (24 distinct proteins) with decreased expression and 128 spots (91 distinct proteins) with increased expression in tumor breast tissue (Supplementary data). Five proteins, Vimentin

(VIME), Peroxiredoxin-2 (PRDX2), Glutathione S-transferase P (GSTP1), Alpha-soluble NSF attachment protein (SNAA) and Alpha-1-antitrypsin (A1AT) were identified with increased expression in both tissues but not at the same corresponding spots, reducing the total number to 110 proteins.

From this number, we selected the seven differentially expressed spots that were common to all five samples, 9 present in four samples, 10 found in three samples and 17 present in two samples, amounting to 43 protein spots (Table II and Figure II).

Table III shows the ten proteins that displayed the highest fold change mean all over the study (CAPG appears twice), the regulation in breast cancer tissue (if up or down regulated) related to non-tumor breast tissue, the number of samples they were identified and the functional class of each one.

Table IV shows a comparison between our data and the current literature, taking into account the main proteins discussed by other authors.

### *Functional classification*

Proteins were classified as to their biological functions in 12 classes, according to Pucci-Minafra *et al.* (15,16): (1)Cytoskeleton and associated proteins; (2)Metabolic enzymes; (3)Molecular chaperones / heat shock proteins; (4)Proteolysis regulation; (5)Detoxification and redox proteins; (6)Cell growth and proliferation regulators; (7)Protein with binding functions; (8)Membrane-associated proteins with multiple activities; (9)Proteins with extracellular activity; (10)Protein biosynthesis; (11)Nucleotide Biosynthesis; (12)Other functions (Figure III).

## **Discussion**

In this study we aimed first of all to describe the differentially expressed proteins by comparing matched samples of IDC and their normal counterpart (tissue collected in the opposite side of the tumor and confirmed as normal by a pathologist) from five patients. Table II shows all proteins identified according to the number of samples they are found in (two to five samples). Through this approach, we could notice that only five proteins were identified in the five samples. This was expected considering the high heterogeneity of

breast cancer and the use of a broad histological classification (IDC), without considering the immunohistochemical markers ER, PR, HER2, Ki-67 and others for sub classification. After this observation, we tried to extract the main group considering the difference in expression. Using the fold change as a parameter, the 10 proteins with the highest fold change (Table IV) will be discussed with focus on their role in BC and their potential as diagnostic biomarkers when compared with normal tissue.

Caspase-14 (CASPE) is a non-apoptotic caspase involved in epithelial differentiation and highly expressed in embryonic tissues. Caspase-14 is unique among the caspase family proteins and it may have a different cellular role than related proteins. A 2005 study associated a higher CASPE expression to high-grade tumors and it seems to be a very early alteration in the pathogenesis of breast cancer (53). CASPE overexpression in breast cancer was also found in two other studies (22,54). In 2011, a study identified *CASP14* as a probable transcriptional target of *Gata-3*, and the overexpression of CASPE in human breast cancer cells has the same effect of GATA3 overexpression, which significantly delayed tumor growth (55).

Enolase molecules are dimers composed by three distinct subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ). When used in cancer characterization and diagnosis,  $\gamma\gamma$  and  $\alpha\gamma$ -enolase are referred to as neuron-specific enolase. Several immunostaining studies reported a high proportion of  $\gamma$ -enolase (ENOG) staining cells detected in some breast carcinomas while no positive staining was observed in non-tumor breast tissue (59,60,61). ENOG high expression is described as a characteristic of neuroendocrine breast cancer, but this study showed increased ENOG expression in IDC in contrast to NTB.

The CAPG is a Gelsolin-related actin-binding protein that is involved in the control of actin-based cell motility and phagocytosis (70,71), once it is involved in cytoplasm. When it is found in cell nucleus its function is unknown, but CAPG is the only member of this family that accumulates at this location (63). We found two spots identified as CAPG, both overexpressed in BCT. CAPG has an increased expression in breast cancer, especially in metastasizing ones, than in normal breast epithelium (63). Kang et al. (2010) also found a higher CAPG expression in breast tumor tissue (35).

Vimentin (VIME) is a type III intermediate filament that maintains cell and tissue integrity (72) and is highly expressed in high-grade ductal breast carcinoma or in tumors with low ER levels (50). Overexpression of vimentin is interpreted as a sign of epithelial-

mesenchymal transition, which is related to tumor cell dedifferentiation, growth, invasion and metastasis in numerous types of cancer, including breast cancer (51). Proteomic studies have reported several vimentin spots at the same sample gel (15,52), probably due to post-translational modifications. Our study found vimentin spots with an increased expression and also, in some cases, with a decrease in BCT. Despite its correlation to malignancy, the role of VIME in cancer regulation is still unclear.

Increased expression of TRFE in breast tumor patients was observed by immunohistochemistry of BCT (17) and by nipple aspirate fluid and serum analysis (73). The primary role of TRFE is to transport iron, derived from dietary absorption and from macrophage recycling, safely around the body and deliver it to growing cells (74). Free iron can be toxic, promoting free radical formation that results in oxidative damage to tissues (75) and also causes lipid peroxidation by converting hydroperoxides into reactive peroxy and alkoxy radicals (76). The decreased expression in BCT found in this study may be due to the balance between cell and serum proteins. Considering that normal tissue presents low cell amount, serum proteins may be more evident when comparing to the high cell amount found in breast cancer tissue (15).

WDR61 is a member of the Paf1 complex, which is well known for promoting RNA polymerase II transcription elongation and transcription-coupled histone modifications. Paf1 complex also plays a role in gene expression and silencing, RNA maturation, DNA repair, cell cycle progression and prevention of disease states in higher eukaryotes (77). A recent study reported that WDR5, another WD repeat-containing protein, is required for MYC to broadly associate with target genes in vivo and to drive tumorigenesis (78). There is a lack of information about its expression in breast cancer and in cancer in general. Nevertheless, due to its participation in several cellular processes, WDR61 should be observed with caution.

The last two groups of proteins, tropomyosins (TPMs) and disulfide isomerases (PDIs), were studied by our group to validate the preliminary data of this study (26, 38). Quantitative real time PCR using a Sybr green protocol was performed in order to analyze the mRNA expression level. Both studies used a very similar sample of the present study, collected at the same center and comparing breast cancer and normal breast tissue. Related to TPMs, a reduced mRNA expression of *TPM1*, increased expression of *TPM3* and no difference in *TPM4* expression in BCT were seen, corroborating the proteomic

analysis just for TPM3, since our data pointed to an increase in TPM1, TPM3 and TPM4 expression in BCT, as well as found in other proteomic studies (15,25). Changes in the tropomyosin expression contribute to the rearrangement of microfilaments, morphological alterations and cell motility (79). Frequently, a decreased expression is associated with tumor development (23,24). As TPMs have several isoforms (high molecular weight and low molecular weight) generated by alternative splicing, more studies are necessary about their regulation levels, e.g. *TPM1* transcript was shown as a potential target of mir-21 in a breast cancer cell line study (80).

The PDIs fully corroborated the proteomic data, showing a higher expression of both genes and an association with lymph node metastasis and tumor grade for *PDIA3*, suggesting their potential use as an aggressiveness marker (38). PDIs act in disulfide bond formation and isomerization. They also play a role as chaperone, by binding polypeptide chains and assisting in the correct protein folding as well as inhibiting unfolding substrates aggregation (81). These proteins are associated to several types of cancer (82,83,84).

### *Functional classes*

According to functional classification, the main classes overexpressed in BCT were metabolic enzymes (21%) and cytoskeleton and associated proteins (20%), while proteins with binding functions (33%) and cytoskeleton and associated proteins (17%) were the major classes of proteins with decreased expression in BCT. We noticed that proteins related to cytoskeleton have great changes in expression levels between tumor and non-tumor tissues and it is known that they play an important role in tumor invasiveness. Protein with binding functions was the most expressive class with decreased expression in BCT, suggesting that proteins with these functions may be essential in tumorigenesis. These data are difficult to compare with those by other authors since the methods used to classify them are not homogeneous. In spite of this lack of regularity, it is important to describe the functional classes in an effort to cluster the big amount of proteins identified by high throughput methods.

### *Comparison with literature data*

Table IV shows a comparison between our data and the data from literature. We can notice several proteins with the same type of regulation expression, the majority

displaying an increased expression in BCT. On the contrary, there were some proteins with conflicting data, without sufficient information or in disagreement with the information described by other authors, as discussed below.

In two spots, fibrinogen beta chain expression was around four folds decreased in BCT. Although observed in a different spot location, FIBB was shown as increased in breast tumor (18). The participation of fibrinogen, fibrin and their degradation products is described in blood clotting, inflammation, angiogenesis and metastasis (19,85), although their role is not sufficiently known yet.

IPYR was found with increased expression in samples of gastric cancer showing a relation with cell migration but not with invasion, and it may be a useful poor prognosis marker for gastric cancers (20). Increased expression was also observed in prostate cancer (21). In a comparative study using breast cancer and healthy mammary cell lines, no significant differential expression was observed (22). A recent study showed that knockdown of *PPA1* (IPYR coding gene) decreased colony formation and viability of MCF7 cells (86).

ATPB was found overexpressed in our study but it has conflicting data about expression in breast cancer. There are evidences of overexpression (27,28) and decreased expression in BCT (29) as well as no expression change observed in a cell-line study (22).

Alpha-1 antitrypsin and haptoglobin were overexpressed in BCT in the present study. Increased expression of acute phase proteins A1AT and HPT in cancer patients' sera may be due to a non-specific inflammatory host response to tumor (87). A serum proteomic analysis suggested that A1T1 may be a useful serum biomarker for early-stage breast cancer screening and diagnosis due to overexpression in patients' sera (11), but two comparative proteomic studies found A1AT decreased in contrast to NTB (18,30). As A1AT and HPT are serum proteins, their overexpression in NBT may have the same explanation of TRFE (15).

IF4A1 and HNRPF were identified at the same spot. IF4A1 is a subunit from translation regulator eIF4F complex and it has a helicase function (88). Recent studies pointed IF4A1 as a promising therapeutic target in ER-negative breast cancer (65,66) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HNRPF) plays a role in regulation of alternative splicing events by participating in hnRNP complexes. Other members of these

complexes were found overexpressed (29,34) but also decreased (89) in BCT. There is a lack of information about this specific protein expression in breast cancer. A colon cancer study also reported overexpression in contrast to adjacent non-tumor tissue (67). Probably because the two proteins showed up together at the same spot, this was recognized as overexpressed in our analysis.

Cytochrome b-c1 complex subunit 1 has been associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) and dysregulation may cause several problems including cancer (90). Hepatocellular cancer showed increased QCR1 expression (68).

Two proteasome subunit alpha types were identified as overexpressed in BCT, PSA3 and PSA5. These alpha subunits are involved in 20S proteasome composition that, together with the 19S, forms the 26S proteasome, which is involved in several biological processes, including cell cycle progression, apoptosis and DNA repair (64). Despite their importance as proteasome subunits, there is little information about expression changes of the two subunits found in this study.

The function of TCPE in cancer is unknown, but this protein subunit participates in the TCP1 ring complex (TRiC). Evidences strongly suggest that TRiC plays a key role in cell cycle progression and that it could be implicated in tumor development (91,92,93). A recent study also showed overexpression in nitric oxid-stimulated NIH/3T3 cells (62).

## **Conclusions**

We conclude that the 2DE coupled MALDI-TOF/MS is a very useful proteomic approach to discriminate proteins with differential expression in breast cancer. With the description of the most important ten proteins, taking the fold change as a parameter, we point to future targets to be studied by several validation and functional methods in search of good biomarkers in early stages and progress of breast cancer.

## **Acknowledgements**

The Authors would like to acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária for the financial support. They also



recognize the Universidade Federal do Paraná, Hospital Nossa Senhora das Graças , Curitiba/BR, for providing structure and professional assistance.

## References

- 1-Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL, CONCORD Working Group: Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 9(8): 730-756, 2008.
- 2-Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA): Estimate/2014 - Cancer Incidence in Brazil. 124p, 2014.
- 3-Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Evans DG, Garcia-Closas M, Gescher AJ, Key TJ, Saxton JM, Harvie MN: Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research* 16(5): 446, 2014.
- 4-Hondermarck H: Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Mol Cell Proteomics* 2(5): 281-291, 2003.
- 5-Gromov P, Moreira JM, Gromova I: Proteomic analysis of tissue samples in translational breast cancer research. *Expert Rev Proteomics* 11(3): 285-302, 2014.
- 6-Zeidan BA, Townsend PA, Garbis SD, Copson E, Cutress RI: Clinical proteomics and breast cancer. *The Surgeon*, 2015. *Epub ahead of print*.
- 7-Oliveira BM, Coorssen JR, Martins-de-Souza D J: 2DE: the phoenix of proteomics. *Proteomics* 104: 140-150, 2014.
- 8-Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan MC, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P J: 2D gels still have a niche in proteomics. *Proteomics* 88: 4-13, 2013.
- 9-Rodrigo MA, Zitka O, Krizkova S, Moullick A, Adam V, Kizek R: MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: a review. *J Pharm Biomed Anal* 95: 245-255, 2014.
- 10-Böhm D, Keller K, Wehrwein N, Lebrecht A, Schmidt M, Kölbl H, Grus FH: Serum proteome profiling of primary breast cancer indicates a specific biomarker profile. *Oncol Rep* 26(5): 1051-1056, 2011.

- 11-López-Árias E, Aguilar-Lemarroy A, Felipe Jave-Suárez L, Morgan-Villela G, Mariscal-Ramírez I, Martínez-Velázquez M, Alvarez AH, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Gutiérrez R: Alpha 1-antitrypsin: a novel tumor-associated antigen identified in patients with early-stage breast cancer. *Electrophoresis* 33(14): 2130-2137, 2012.
- 12-Qin XJ and Ling BX: Proteomic studies in breast cancer. *Oncol Lett* 3(4): 735–743, 2012.
- 13-Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- 14-Costa GG, Kaviski R, Souza LE, Urban CA, Lima RS, Cavalli IJ, Ribeiro EM: Proteomic analysis of non-tumoral breast tissue. *Genet Mol Res* 10(4): 2430-2442, 2010.
- 15-Pucci-Minafra I, Cancemi P, Marabeti MR, Albanese NN, Di Cara G, Taormina P, Marrazzo A: Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and nontumoral adjacent counterparts. *Proteomics Clin Appl* 1: 118-129, 2007.
- 16-Pucci-Minafra I, Cancemi P, Fontana S, Minafra L, Feo S, Becchi M, Freyria AM, Minafra S: Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. *Proteomics* 6: 2609-2625, 2006.
- 17-Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ: Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *The Lancet* 2: 390-392, 1980.
- 18-Somiari RI, Sullivan A, Russell S, Somiari S, Hu H, Jordan R, George A, Katenhusen R, Buchowiecka A, Arciero C, Brzeski H, Hooke J, Shriver C: High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* 3(10): 1863-1873, 2003.
- 19-Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3(8): 1894-1904, 2005.
- 20-Jeong SH, Ko GH, Cho YH, Lee YJ, Cho BI, Ha WS, Choi SK, Kim JW, Lee CW, Heo YS, Shin SH, Yoo J, Hong SC: Pyrophosphatase overexpression is associated with cell migration, invasion, and poor prognosis in gastric cancer. *Tumor Biol* 33: 1889-1898, 2012.

- 21-Alexander H, Palmberg C, Auer G, Hellström M, Franzén B, Jörnvall H, Egevad L: Proteomic analysis of protein expression in prostate cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 27(5): 263-272, 2005.
- 22-Selicharová I, Smutná K, Sanda M, Ubik K, Matousková E, Bursíková E, Brozová M, Vydra J, Jiráček, J: 2-DE analysis of a new human cell line EM-G3 derived from breast cancer progenitor cells and comparison with normal mammary epithelial cells. *Proteomics* 7(9): 1549-1559, 2007.
- 23-Bhattacharya B, Prasad GL, Valverius EM, Salomon DS, Cooper HL: Tropomyosins of human mammary epithelial cells - consistent defects of expression in mammary carcinoma cell lines. *Cancer Research* 50(7): 2105-2112, 1990.
- 24-Franzén B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, Auer G: Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions - down-regulation of cytokeratins. *British Journal of Cancer* 74(10): 1632-1638, 1996.
- 25-Kabbage M, Trimeche M, Bergaoui S, Hammann P, Kuhn L, Hamrita B, ben Nasr H, Chaieb A, Chouchane L, Chahed K: Calreticulin expression in infiltrating ductal breast carcinomas: relationships with disease progression and humoral immune responses. *Tumour Biol* 34(2): 1177-1188, 2013.
- 26-Carvalho CMS. Análise da expressão gênica de Tropomiosinas em carcinomas mamários. Master Dissertation. Genetics Post Graduation Program, Genetics Department, Federal University of Paraná. 2013.
- 27-Alldridge L, Metodieva G, Greenwood C, Al-Janabi K, Thwaites L, Sauven P, Metodiev M: Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. *J Proteome Res* 7(4): 1458-1469, 2008.
- 28-Huang TC, Chang HY, Hsu CH, Kuo WH, Chang KJ, Juan HF: Targeting therapy for breast carcinoma by ATP synthase inhibitor aurovertin B. *J Proteome Res* 7: 1433-1444, 2008.
- 29-Sutton CW, Rustogi N, Gurkan C, Scally A, Loizidou MA, Hadjisavvas A, Kyriacou K: Quantitative proteomic profiling of matched normal and tumor breast tissues. *J Proteome Res*. 9(8): 3891-3902, 2010.

- 30-Deng SS, Xing TY, Zhou HY, Xiong RH, Lu YG, Wen B, Liu SQ, Yang HJ: Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 4(3): 165-172, 2006.
- 31-Ebert MP, Kruger S, Fogeron ML, Lamer S, Chen J, Pross M, Schulz HU, Lage H, Heim S, Roessner A, Malfertheiner P, Rocken C: Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics* 5: 1693-1704, 2005.
- 32-Perroud B, Lee J, Valkova N, Dhirapong A, Lin PY, Fiehn O, Kultz D, Weiss RH: Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer* 5: 64, 2006.
- 33-Huang Q, Huang Q, Lin W, Lin J, Lin X: Potential roles for PA28beta in gastric adenocarcinoma development and diagnosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1275-1282, 2010.
- 34-Wulfkuhle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M, Chen S, Shu H, Sahin A, Kurek R, Wallwiener D, Merino MJ, Petricoin EF 3rd, Zhao Y, Steeg PS: Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62(22): 6740-6749, 2002.
- 35-Kang S, Kim MJ, An H, Kim BG, Choi YP, Kang KS, Gao MQ, Park H, Na HJ, Kim HK, Yun HR, Kim DS, Cho NH: Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer. *J Proteome Res* 9(11): 5638-5645, 2010.
- 36-Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B: Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 87(6): 635-644, 2002.
- 37-Moon HG, Jeong SH, Ju YT, Jeong CY, Lee JS, Lee YJ, Hong SC, Choi SK, Ha WS, Park ST, Jung EJ: Up-regulation of RhoGDI2 in human breast cancer and its prognostic implications. *Cancer Res Treat* 42(3): 151-6, 2010.
- 38-Ramos FS, Serino LTR, Carvalho CMS, Lima RS, Urban CA, Cavalli IJ, Ribeiro EMSF: PDIA3 and PDIA6 genes expression as an aggressiveness marker in primary ductal breast cancer. *Genet Mol Res*. 2015. *In Press*.
- 39-Song MN, Moon PG, Lee JE, Na M, Kang W, Chae YS, Park JY, Park H, Baek MC: Proteomic analysis of breast cancer tissues to identify biomarker candidates by gel-

assisted digestion and label-free quantification methods using LC-MS/MS. *Arch Pharm Res* 35(10):1839-1847, 2012.

40-Song Y, Yang Z, Ke Z, Yao Y, Hu X, Sun Y, Li H, Yin J, Zeng C: Expression of 14-3-3 $\gamma$  in patients with breast cancer: correlation with clinicopathological features and prognosis. *Cancer Epidemiol* 36(6): 533-536, 2012.

41-Li N, Wang H, Fan J, Tong C, Yang J, Wei H, Yi J, Ling R: Overexpression of 14-3-3 $\theta$  promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in breast carcinoma. *Oncotarget* 5(1): 249-257, 2014.

42-Lapillonne A, Coué O, Friederich E, Nicolas A, Del Maestro L, Louvard D, Robine S, Sastre-Garau X: Expression patterns of L-plastin isoform in normal and carcinomatous breast tissues. *Anticancer Res* 20(5A): 3177-3182, 2000.

43-Carcoforo P, Ura B, Mischiati C, Squerzanti M, Lanzara V, Cervellati C, Calza R, De Laureto PP, Frare E, Portinari M, Feriotto G, Lanzara S, Agostinelli E, Bergamini CM: Comparative proteomic analysis of ductal breast carcinoma demonstrates an altered expression of chaperonins and cytoskeletal proteins. *Mol Med Rep* 7(5): 1700-1704, 2013.

44-Hudelist G, Singer CF, Pischinger KI, Kaserer K, Manavi M, Kubista E, Czerwenka KF: Proteomic analysis in human breast cancer: identification of a characteristic protein expression profile of malignant breast epithelium. *Proteomics* 6(6): 1989-2002, 2006.

45-Grzegorzolka J, Kurnol K, Piotrow P, Pula B, Kobierzycki C, Piotrowska A, Jablonska K, Wojnar A, Rys J, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M: Hsp-27 expression in invasive ductal breast carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 50(4): 527-533, 2012.

46-Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA and Chae HZ: Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 21: 2085-2090, 2001.

47-Karihtala P, Mantyniemi A, Kang SW, Kinnula VL and Soini Y: Peroxiredoxins in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 3418-3424, 2003.

48-Chua PJ, Lee EH, Yu Y, Yip GW, Tan PH, Bay BH: Silencing the Peroxiredoxin III gene inhibits cell proliferation in breast cancer. *Int J Oncol* 36(2): 359-364, 2010.

49-Niu Y, Liu T, Tse GM, Sun B, Niu R, Li HM, Wang H, Yang Y, Ye X, Wang Y, Yu Q, Zhang F. Increased expression of centrosomal alpha, gamma-tubulin in atypical ductal hyperplasia and carcinoma of the breast. *Cancer Sci* 100(4): 580-587, 2009.

- 50-Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK: Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 2015. *Epub ahead of print*.
- 51-Satelli A and Li S: Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 68: 3033-3046, 2011.
- 52-Milioli HH, Santos Sousa K, Kaviski R, Dos Santos Oliveira NC, De Andrade Urban C, De Lima RS, Cavalli IJ, De Souza Fonseca Ribeiro EM: Comparative proteomics of primary breast carcinomas and lymph node metastases outlining markers of tumor invasion. *Cancer Genomics Proteomics* 12(2): 89-101, 2015.
- 53-Krajewska M, Kim H, Shin E, Kennedy S, Duffy MJ, Wong YF, Marr D, Mikolajczyk J, Shabaik A, Meinhold-Heerlein I, Huang X, Banares S, Hedayat H, Reed JC, Krajewski S: Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clin Cancer Res* 11(15): 5462-5471, 2005.
- 54-Helfman DM, Flynn P, Khan P, Saeed A: Tropomyosin as a Regulator of Cancer Cell Transformation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 644: 124-131, 2008.
- 55-Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Vaillant F, Gyorki DE, Wu D, Holroyd S, Breslin K, Ward T, Shi W, Bath ML, Deb S, Fox SB, Smyth GK, Lindeman GJ, Visvader JE: Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14. *Mol Cell Biol* 31(22): 4609-4622, 2011.
- 56-Giri A, Bajpai S, Trenton N, Jayatilaka H, Longmore GD, Wirtz D: The Arp2/3 complex mediates multigeneration dendritic protrusions for efficient 3-dimensional cancer cell migration. *FASEB J* 27(10): 4089-4099, 2013.
- 57-Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, Hanash SM: Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7: 3328-3335, 2001.
- 58-Ismail IA, Kang HS, Lee HJ, Kim JK, Hong SH: DJ-1 upregulates breast cancer cell invasion by repressing KLF17 expression. *Br J Cancer* 110(5): 1298-1306, 2014.
- 59-Matsushima S, Mori M, Adachi Y, Matsukuma A, Sugimachi K: S100 protein positive human breast carcinomas: an immunohistochemical study. *J Surg Oncol* 55: 108-113, 1994.

- 60-Nesland J, Holm R, Johannessen J, Gould V: Neuron-specific enolase immunostaining in the diagnosis of breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. Its usefulness and limitations. *J Pathol* 148: 35-43, 1986.
- 61-Kirillina MP, Loskutova KS, Innokent'eva AS, Lushnikova EL, Nepomnyashchikh LM: Immunohistochemical reactions of primary neuroendocrine breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 158(3): 368-370, 2015.
- 62-Shim DH, Lim JW, Kim H: Differentially expressed proteins in nitric oxide-stimulated NIH/3T3 fibroblasts: implications for inhibiting cancer development. *Yonsei Med J* 56(2): 563-571, 2015.
- 63-Renz M, Betz B, Niederacher D, Bender HG, Langowski J: Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG. *Int J Cancer* 122(7): 1476-1482, 2008.
- 64-Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(2): 104-115, 2009.
- 65-Stoneley M, Willis AE: eIF4A1 is a promising new therapeutic target in ER-negative breast cancer. *Cell Death and Differentiation* 22: 524–525, 2015.
- 66-Modelska A, Turro E, Russell R, Beaton J, Sbarrato T, Spriggs K, Miller J, Gräf S, Provenzano E, Blows F, Pharoah P, Caldas C, Le Quesne J: The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. *Cell Death Dis* 6: e1603, 2015.
- 67-Balasubramani M, Day BW, Schoen RE, Getzenberg RH: Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer. *Cancer Res* 66(2): 763-9, 2006.
- 68-Khan R, Zahid S, Wan YJ, Forster J, Karim AB, Nawabi AM, Azhar A, Rahman MA, Ahmed N: Protein expression profiling of nuclear membrane protein reveals potential biomarker of human hepatocellular carcinoma. *Clin Proteomics* 10(1): 6, 2013.
- 69-Liang S, Singh M, Gam LH: The Differential Expression of Aqueous Soluble Proteins in Breast Normal and Cancerous Tissues in Relation to Stage and Grade of Patients. *J Biomed Biotechnol* 2010: 516469, 2010.

- 70-Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D: Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 61: 2614-2623, 2004.
- 71-Witke W, Li W, Kwiatkowski DJ, Southwick FS: Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *J Cell Biol* 154: 775-784, 2001.
- 72-Coulombe PA and Wong P: Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6: 699-706, 2004.
- 73-Mannello F, Tonti GA, Simone P, Ligi D, Medda V: Iron-binding proteins and C-reactive protein in Nipple Aspirate Fluids: role of Iron-driven inflammation in breast cancer microenvironment? *Am J Transl Res* 3(1): 100-113, 2011.
- 74-van Campenhout A, van Campenhout CM, Lagrou AR, Manuel-y-Keenoy B: Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus. *Free Radic Res* 37(10): 1069-1077, 2003.
- 75-Rice-Evans C: Oxidised low density lipoproteins. In *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*(Poli, G. et al., eds): 323–339, 1993.
- 76-Gomme PT, McCann KB, Bertolini J: Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 10(4): 267-273, 2005.
- 77-Tomson BN, Arndt KM: The many roles of the conserved eukaryotic Paf1 complex in regulating transcription, histone modifications, and disease states. *Biochim Biophys Acta* 1829(1): 116-126, 2013.
- 78-Thomas LR, Wang Q, Grieb BC, Phan J, Foshage AM, Sun Q, Olejniczak ET, Clark T, Dey S, Lorey S, Alicie B, Howard GC, Cawthon B, Ess KC, Eischen CM, Zhao Z, Fesik SW, Tansey WP: Interaction with WDR5 Promotes Target Gene Recognition and Tumorigenesis by MYC. *Mol Cell* 58(3): 440-452, 2015.
- 79-Helfman DM, Flynn P, Khan P, Saeed A: Tropomyosin as a Regulator of Cancer Cell Transformation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 644: 124-131, 2008.
- 80-Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY: MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 282(19): 14328-14336, 2007.
- 81-Wilkinson B, Gilbert HF: Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699(1-2): 35-44, 2004.



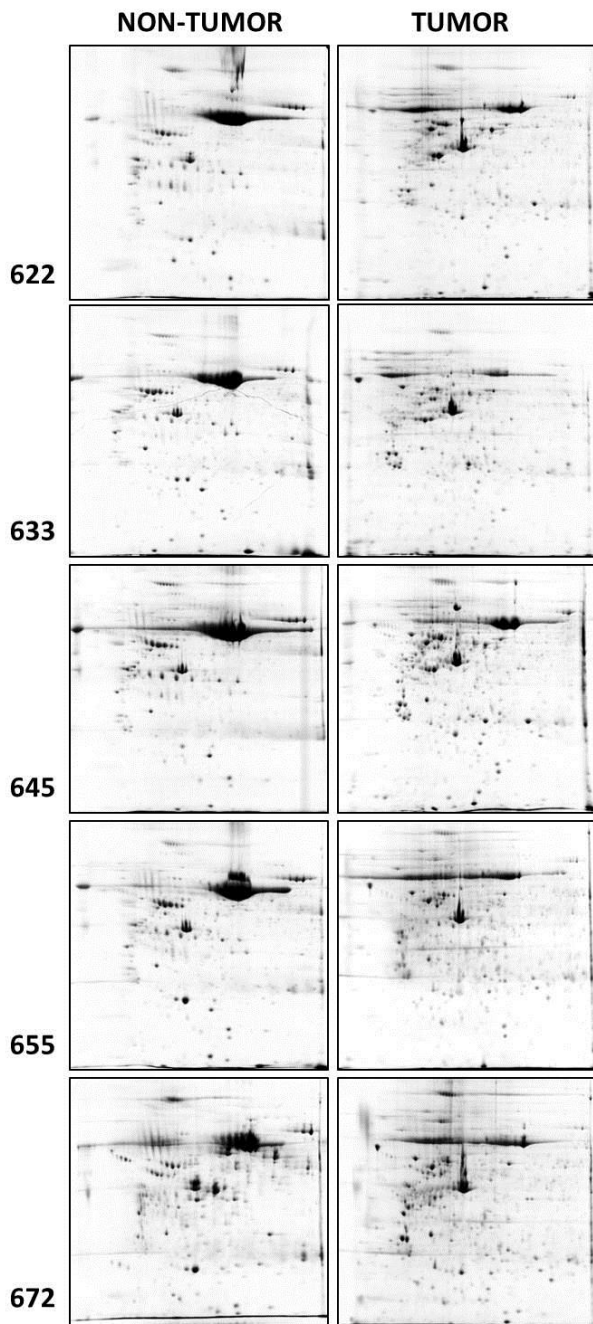
- 82-Leys CM, Nomura S, Lafleur BJ, Ferrone S, Kaminishi M, Montgomery E, Goldenring JR: Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery* 141(1): 41-50, 2007.
- 83-Pressinotti NC, Klocker H, Schafer G, Duc Luu V, Luuruschhaupt M, Kuner R, Steiner E, Poustka A, Bartsch G, Sultmann H: Differential expression of apoptotic genes PDIA3 and MAP3K5 distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. *Molecular Cancer* 1: 63-71, 2009.
- 84-Ayshamgul H, Ma H, Ilyar S, Zhang LW, Abulizi A: Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chinese Medical Journal* 124(3): 341-346, 2011.
- 85-Kołodziejczyk J, Ponczek MB: The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Wspolczesna Onkol* 17(2): 113-119, 2013.
- 86-Mishra DR, Chaudhary S, Krishna BM, Mishra SK: Identification of critical elements for regulation of Inorganic Pyrophosphatase (PPA1) in MCF7 Breast Cancer Cells. *PLoS One* 10(4): e0124864, 2015.
- 87-Hamrita B, Chahed K, Trimeche M, Guillier CL, Hammann P, Chaïeb A, Korbi S, Chouchane L: Proteomics-based identification of alpha1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. *Clin Chim Acta* 404(2): 111-118, 2009.
- 88-Luo Y, Zhang J, Liu Y, Shaw AC, Wang X, Wu S, Zeng X, Chen J, Gao Y, Zheng D: Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. *Mol Biotechnol* 29(3): 233-244, 2005.
- 89-Flynn A, Proud CG: The role of eIF4 in cell proliferation. *Cancer Surv* 27: 293-310, 1996.
- 90-Xia D, Esser L, Tang WK, Zhou F, Zhou Y, Yu L, Yu CA: Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function. *Biochim Biophys Acta* 1827(11-12): 1278-1294, 2013.
- 91-Won KA, Schumacher RJ, Farr GW, Horwich AL, Reed SI: Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol* 18: 7584-7589, 1998.

92-Hansen,WJ, Ohh M, Moslehi J, Kondo K, Kaelin WG, Welch WJ: Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 22: 1947-1960, 2002.

93-Boudiaf-Benmammar C, Cresteil T, Melki R: The cytosolic chaperonin CCT/TRiC and cancer cell proliferation. *PLoS One* 8(4): e60895, 2013.

### **Ethical Policies and Standards**

We declare that the principles of the Declaration of Helsinki and Title 45, U.S Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects, effective December 13, 2001 were followed. The local Ethical Committee for research involving human beings approved this research.



**Figure 1:** Reference gels of non-tumor and tumor tissue from each sample.

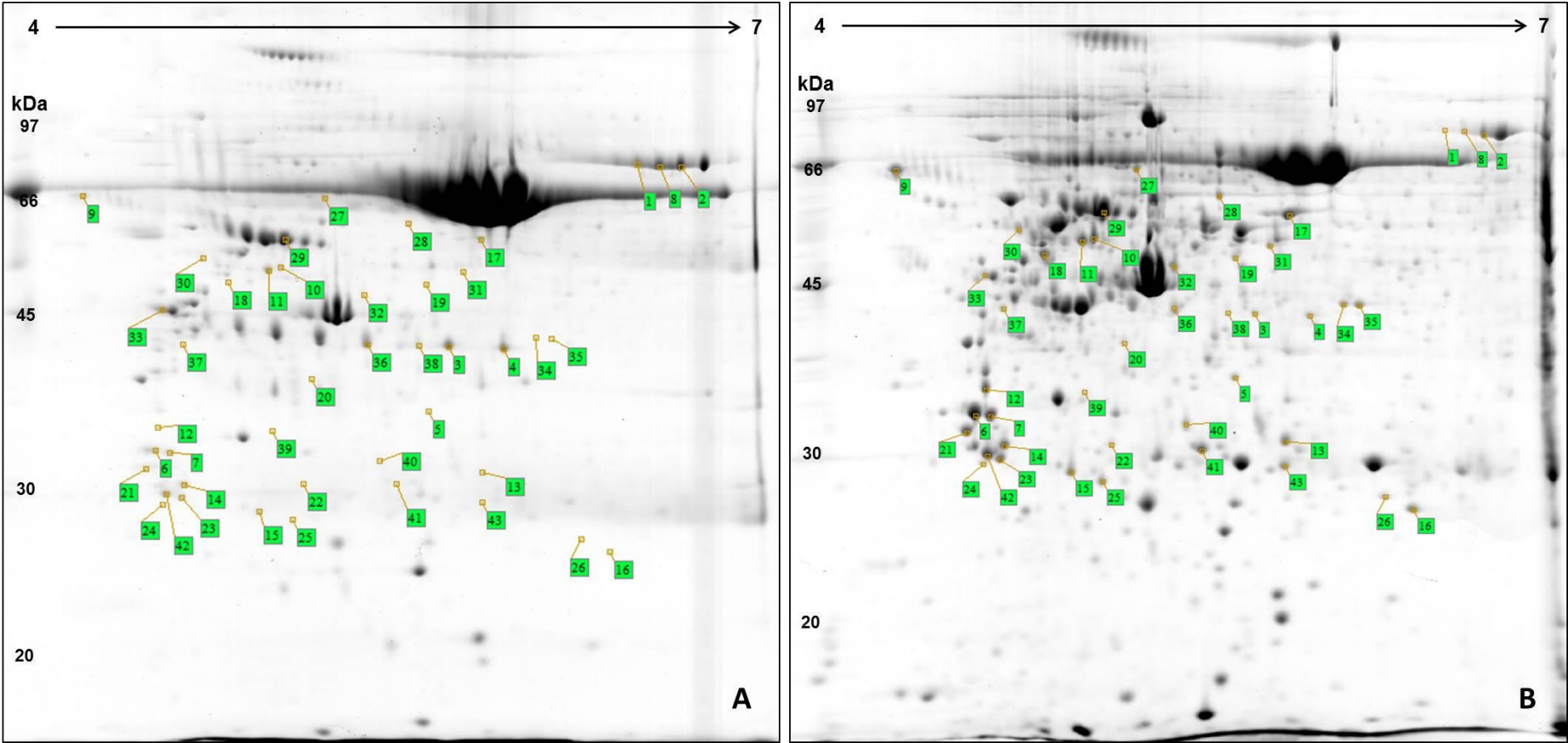
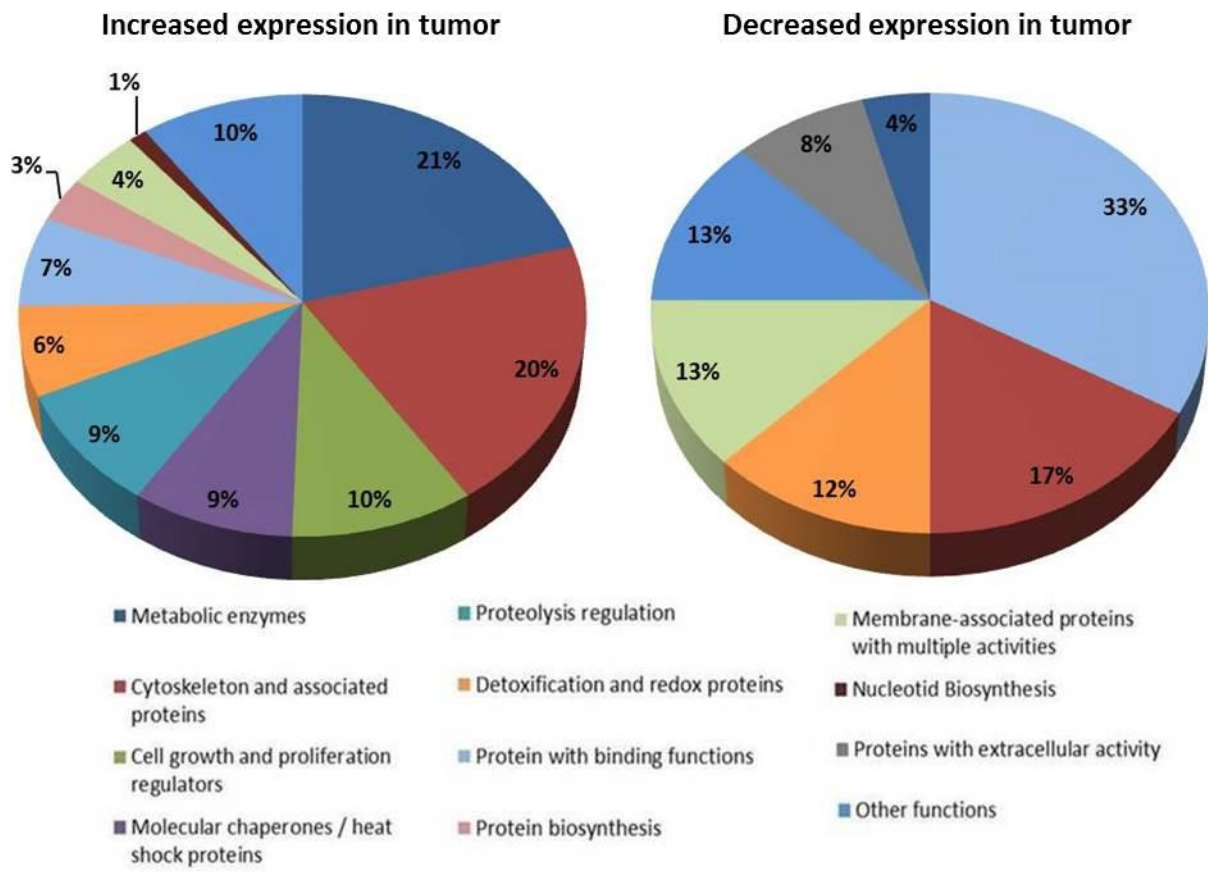


Figure II: CP645 reference gel from (A) non tumor and (B) tumor tissue.



**Figure III.** All identified proteins distributed by biological function according increased or decreased expression in tumor samples.

**Table I.** Patient's clinicopathological data.

Patient code	Age	Histopathology	Tumor Grade	Tumor size (mm)	ER	PR	HER2
CP622	71	IDC	I	30	positive	positive	-
CP633	71	IDC	II	40	positive	positive	positive
CP645	63	IDC	II	58	positive	positive	negative
CP655	45	IDC	II	35	positive	positive	negative
CP672	43	IDC	II	30	positive	negative	negative

Note: IDC, Invasive ductal carcinoma; ER, Estrogen receptor; PR, Progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2. Tumor Size was determined by the maximum diameter of the primary breast tumor in mm.

**Table II.** Differentially expressed proteins according to the number of samples they were identified.

Sample	Spot	Protein	Access Swiss-prot	Gene (UniGene)	Fold change Mean $\pm$ SD
Found in all samples	1*	TRFE - Serotrasferrin	P02787	TF	5.9 $\pm$ 1.83
	2*	TRFE - Serotrasferrin	P02787	TF	3.4 $\pm$ 1.31
	3*	FIBB - Fibrinogen beta chain	P02675	FGB	4.0 $\pm$ 1.13
	4*	FIBB - Fibrinogen beta chain	P02675	FGB	3.7 $\pm$ 1.77
	5	IPYR - Inorganic pyrophosphatase	Q15181	PPA1	3.9 $\pm$ 1.43
	6	TPM4 - Tropomyosin alpha-4 chain	P67936	TPM4	4.1 $\pm$ 1.74
	7	TPM3 - Tropomyosin alpha-3 chain	P06753	TPM3	6.8 $\pm$ 1.66
Found in four samples	8*	TRFE - Serotrasferrin	P0287	TF	4.4 $\pm$ 0.96
	9	CALR - Calreticulin	P27797	CALR	4.7 $\pm$ 1.16
	10	PDIA6 - Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	PDIA6	5.2 $\pm$ 3.01
	11	ATPB - ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	ATP5B	2.5 $\pm$ 0.26
	12	TPM1 - Tropomyosin alpha-1 chain	P09493	TPM1	8.9 $\pm$ 6.09
	13	PSME1 - Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	PSME1	3.0 $\pm$ 0.61
	14	1433G - 14-3-3 protein gamma	P61981	YWHAG	2.2 $\pm$ 0.17
	15	GDIR1 - Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	ARHGDIA	3.0 $\pm$ 1.04
16	PARK7 - Protein DJ-1	Q99497	PARK7	3.0 $\pm$ 0.69	
Found in three samples	17	PDIA3 - Protein disulfide-isomerase A3	P30101	PDIA3	4.8 $\pm$ 2.72
	18	ENOG - Gamma-enolase	P09104	ENO2	11.6 $\pm$ 14.51
	19	QCR1 - Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	UQCRC1	3.0 $\pm$ 0.61
	20	SEC13 - Protein SEC13 homolog	P55735	SEC13	4.4 $\pm$ 1.71
	21	1433E - 14-3-3 protein epsilon	P62258	YWHAE	4.0 $\pm$ 1.0
	22	PSA3 - Proteasome subunit alpha type-3	P25788	PSMA3	3.0 $\pm$ 0.85
	23	1433E - 14-3-3 protein epsilon	P62258	YWHAB /	3.3 $\pm$ 0.85
		1433Z - 14-3-3 protein zeta-delta	P63104	YWHAZ	
	24	PSA5 - Proteasome subunit alpha type-5	P28066	PSMA5	2.7 $\pm$ 0.42
	25	GDIR2 - Rho GDP-dissociation inhibitor 2	P52566	ARHGDIB	3.8 $\pm$ 0.76
26	PRDX3 - Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	PRDX3	3.0 $\pm$ 0.67	
Found in two samples	27	PLSL - Plastin - 2	P13796	LCP1	3.1 $\pm$ 0.92
	28	TCPE - T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	CCT5	3.1 $\pm$ 1.34
	29	TBA1B - Tubulin alpha-1B chain	P68363	TUBA1B	4.0 $\pm$ 2.4
	30	A1AT - Alpha-1-antitrypsin	P01009	SERPINA1	2.9 $\pm$ 0.92
	31	ARP3 - Actin-related protein 3	P61158	ACTR3	3.9 $\pm$ 0.42
	32	IF4A1 - Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60842	EIF4A1	2.9 $\pm$ 0.35
		HNRPF - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	P52597	HNRNPF	
	33*	VIME - Vimentin	P08670	VIM	2.2 $\pm$ 0.21
	34	CAPG - Macrophage-capping protein	P40121	CAPG	8.8 $\pm$ 2.4
	35	CAPG - Macrophage-capping protein	P40121	CAPG	5.5 $\pm$ 3.68
	36*	HPT - Haptoglobin	P00738	HP	2.4 $\pm$ 0.0
	37	VIME - Vimentin	P08670	VIM	8.45 $\pm$ 7.42
	38	PDIA3 - Protein disulfide-isomerase A3	P30101	PDIA3	2.15 $\pm$ 0.07
	39	WDR61 - WD repeat-containing protein 61	Q9GZS3	WDR61	5.05 $\pm$ 2.76
	40	PSME2 - Proteasome activator complex subunit 2	Q9UL46	PSME2	3.7 $\pm$ 0.71
	41	CASPE - Caspase-14	P31944	CASP14	26.1 $\pm$ 14.71
	42	1433Z - 14-3-3 protein zeta/delta	P63104	YWHAZ	3.1 $\pm$ 0.42
43	HSPB1 - Heat shock protein beta-1	P04792	HSPB1	4.35 $\pm$ 2.47	

Note: Identified proteins with differential expression above 2 folds ( $p < 0.05$ ). \*proteins with decreased expression in tumor tissue; SD, standard deviation.

**Table III.** Most representative proteins based on their fold change.

Protein	Fold change (Mean)	Regulation in BCT	Samples (n)	Functional classification
CASPE - Caspase-14	26,1	up	2	cell growth and proliferation regulator
ENOG - Gamma-enolase	11,6	up	3	metabolic enzyme
TPM1 - Tropomyosin alpha-1 chain	8,9	up	4	cytoskeleton and associated proteins
CAPG - Macrophage-capping protein	8,8	up	2	cytoskeleton and associated proteins
VIME - Vimentin	8,45	up	2	cytoskeleton and associated proteins
TPM3 - Tropomyosin alpha-3 chain	6,8	up	5	cytoskeleton and associated proteins
TRFE - Serotrasferrin	5,9	down	5	binding function
CAPG - Macrophage-capping protein	5,5	up	2	cytoskeleton and associated proteins
PDIA6 - Protein disulfide-isomerase A6	5,2	up	4	molecular chaperone / HSP
WDR61 - WD repeat-containing protein 61	5,05	up	2	Other functions
PDIA3 - Protein disulfide-isomerase A3	4,8	up	3	molecular chaperone / HSP



**Table IV.** Comparison between the data of the present study and current literature.

<b>Protein</b>	<b>Expression in the present work</b>	<b>Expression described elsewhere</b>	<b>Reference</b>
TRFE	Decreased	Increased	15,17
FIBB	Increased	Decreased	18,19
IPYR	Increased	No difference	20-22
TPM1,3,4	Increased	Decreased	15,23-26
ATPB	Increased	Conflicting data	22,27-29
A1AT	Increased	Decreased	11,18,30
HPT	Increased	Decreased	15,18
PSM1,2	Increased	Increased	18,29,31-33
GDIR1,2	Increased	Increased	15,34-37
PDIA3,6	Increased	Increased	27,38,39
CALR	Increased	Increased	39,25
1433G,Z,T	Increased	Increased	27,34,40,41
PLSL	Increased	Increased	27,42
HSPB1	Increased	Increased	43-45
PRDX3	Increased	Increased	46-48
TBA1B	Increased	Increased	49
VIME	Increased	Increased	16,50-52
CASPE	Increased	Increased	22,53-55
ARP3	Increased	Increased	34,56
PARK7	Increased	Increased	57,58
ENOG	Increased	Increased	59-61
TCPE	Increased	Lack of information	62
CAPG	Increased	Increased	35,63
PSA3,5	Increased	Lack of information	64
WDR61	Increased	Lack of information	-
IF4A1	Increased	Lack of information	65,66
HNRPF	Increased	Conflicting data	67
QCR1	Increased	Lack of information	68
SEC13	Increased	Increased	69