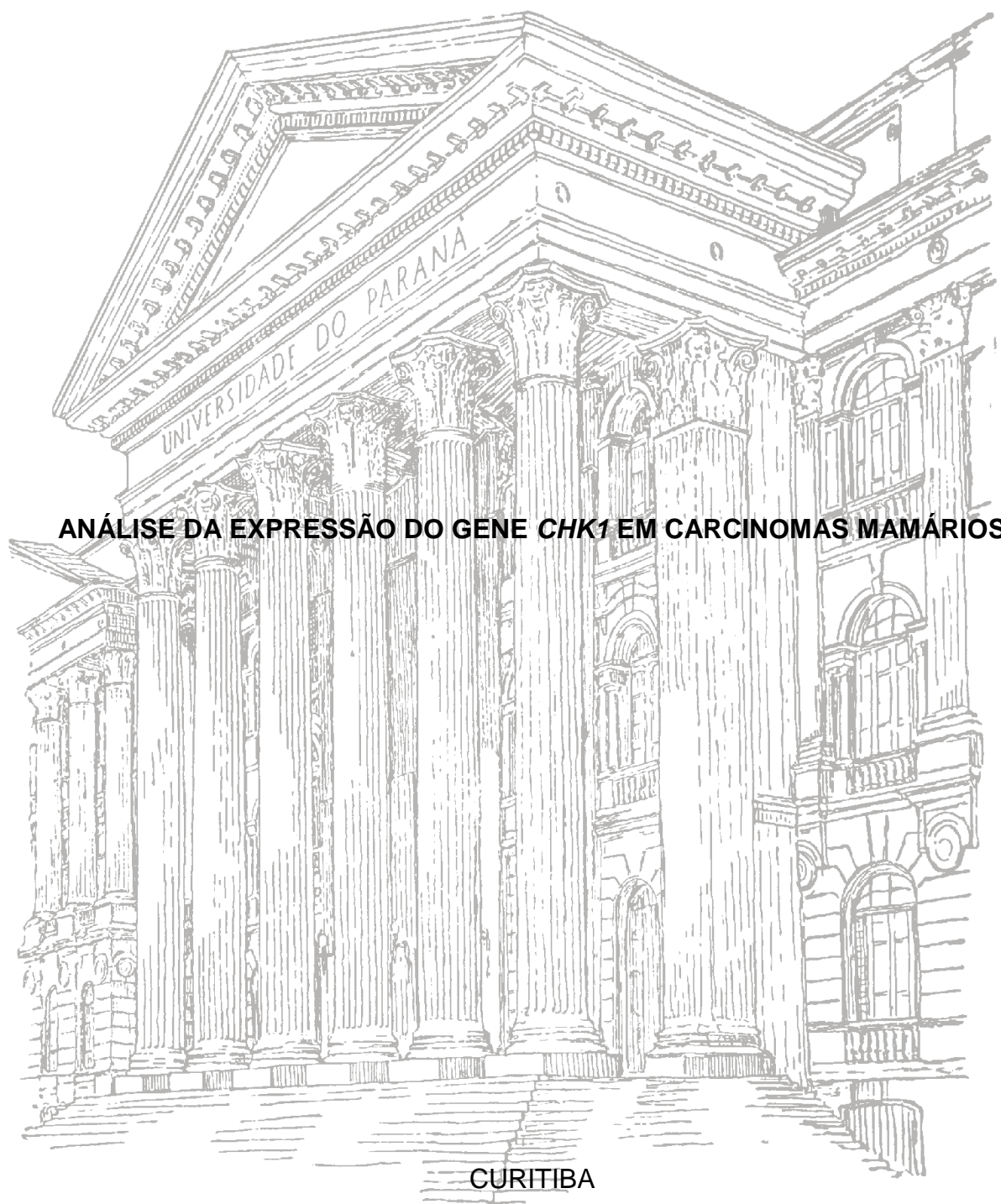


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRO TAMIÃO RODRIGUES SERINO



ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *CHK1* EM CARCINOMAS MAMÁRIOS

CURITIBA

2013

LEANDRO TAMIÃO RODRIGUES SERINO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *CHK1* EM CARCINOMAS MAMÁRIOS

Trabalho apresentado como requisito para o cumprimento da disciplina Estágio Supervisionado em Biologia II (BIO027) do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas



**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos dezanove dias do mês de março de 2013, a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta pelos professores Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro (orientadora), Ricardo Lehtonen R. de Souza e Cíntia Callegari Coelho, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia intitulada “Análise da expressão do gene *CHK1* em carcinomas mamários”, de autoria do acadêmico Leandro Tamião Rodrigues Serino.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota DEZ (10,0).

Prof.(a) Orientador(a)

Membro da Comissão

Membro da Comissão

Curitiba, 19 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, pela oportunidade que me deram de fazer parte desse grupo, pelos ensinamentos ao longo desse período, pela disponibilidade e atenção e como exemplo de pessoa e pesquisadores.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza e MSc. Cíntia Callegari Coêlho, por aceitarem o convite e contribuir com críticas e sugestões ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética pelos bons momentos vividos no ambiente de trabalho e pelas amizades que ficarão comigo para sempre. Em especial, à Sarah por tudo que me ensinou desde que cheguei ao laboratório e à Talita, pelos 5 anos estudando juntos e por todas as conversas compartilhadas e por sempre estar disposta a ouvir minhas angústias, seja da vida pessoal ou não.

A todos meus amigos que sempre foram muito importantes.

À Elayne, que mesmo não estando aqui, sempre me deu muita força e apoio com suas belas palavras e por todo seu carinho.

Aos meus pais João Rodrigues Serino e Odete Tamião Rodrigues Serino e, meu irmão Douglas Tamião Rodrigues Serino por serem os responsáveis por eu estar aqui e por sempre acreditarem em meus sonhos.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

À Deus, pois Ele sempre está ao nosso lado!

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida”.

Henry Poincaré

RESUMO

Mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama por ano em todo o mundo, sendo este tipo de câncer o mais incidente na população feminina, tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. Análises de expressão de genes envolvidos no reparo do DNA, assim como na regulação do ciclo celular, têm demonstrado que a elevada expressão destes genes está associada com o desenvolvimento de câncer. O gene *CHK1* foi mapeado em 11q24.2 e está envolvido em mecanismos que preservam a integridade do genoma durante o ciclo normal das células. A fosforilação da proteína *CHK1* ocorre na serina 317 e serina 345 em resposta à radiação ionizante, radiação ultravioleta e hidroxiuréia, ativando o ponto de checagem do ciclo celular em S e G2. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão do gene *CHK1* em tumores primários de mama (n = 34) e em tecido não tumoral da mama contralateral (n = 8), assim como analisar os perfis de expressão entre tumores com a presença (n = 15) ou ausência (n = 19) de metástase e grau histológico I e II (n = 25) em relação aos de grau III (n = 9). A expressão relativa desse gene foi determinada por qRT-PCR, utilizando o método de Quantificação Relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A média dos valores de expressão relativa de *CHK1* em tumores primários de mama foi igual a $3,52 \pm 2,52$ e no tecido não tumoral da mama contralateral igual a $0,81 \pm 0,42$. A média dos valores de expressão relativa em tumores que apresentavam metástase foi de $4,68 \pm 3,21$ e nos sem metástase igual a $2,60 \pm 1,29$. Tumores com grau I e II apresentaram, em média, expressão relativa de $3,02 \pm 2,39$, enquanto que em tumores de grau III a média foi igual a $4,90 \pm 2,48$. As diferenças entre as médias foram estatisticamente significativas. Estes dados sugerem que alterações nos níveis de expressão do gene *CHK1* estejam envolvidas com a origem e progressão tumoral.

Palavras-chave: Câncer de mama. *CHK1*. Expressão gênica.

ABSTRACT

Over one million women are diagnosed with breast cancer annually worldwide and this type of cancer is the most frequent one in the female population, both in developing countries as in developed countries. Expression analysis of genes involved in DNA repair as well as in cell cycle regulation has demonstrated that the elevated expression of these genes is associated with the development of cancer. The *CHK1* gene was mapped in the 11q24.2 and it is involved in mechanisms that preserve the integrity of the genome during normal cell cycle. The CHK1 protein phosphorylation occurs at serine 317 and serine 345 in response to ionizing radiation, ultraviolet radiation and hydroxyurea, activating the S and G2 checkpoint of the cell cycle. The objective of this study was to analyze *CHK1* gene expression in primary breast tumors (n = 34) compared with non-tumor tissue in the contralateral breast (n = 8), as well as to analyze the expression profiles between tumors with the presence (n = 15) or absence (n = 19) of metastasis and tumor grade I and II (n = 25) relative to grade III (n = 9). The relative gene expression for this gene was determined by qRT-PCR, using the method of Relative Quantification $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The mean of relative expression of *CHK1* in primary breast tumors was equal to 3.52 ± 2.52 and non-tumor tissue from contralateral breast was 0.81 ± 0.42 . The mean relative expression in tumors that had metastasized was 4.68 ± 3.21 and without metastasis equal to 2.60 ± 1.29 . Tumors with grade I and II had an average relative expression of 3.02 ± 2.39 , whereas in grade III tumors average was equal to 4.90 ± 2.48 . Differences between means were statistically significant. These data suggest that alterations in levels of *CHK1* gene expression is involved in the origin and progression of the tumor.

Key words: Breast cancer. *CHK1*. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA E HISTOLOGIA DA MAMA	10
FIGURA 2 - ESTÁGIOS DO CÂNCER DE MAMA	12
FIGURA 3 - VIA DE ATUAÇÃO DO <i>CHK1</i> NOS PROCESSOS DO CICLO CELULAR	22
FIGURA 4 - GENES DE REFERÊNCIA INCLUÍDOS NO CARTÃO <i>TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL</i> PARA ANÁLISE DE ESTABILIDADE ATRAVÉS DO <i>SOFTWARE DATA ASSIST V.3.0</i>	32
FIGURA 5 - GRÁFICO DE DISPERSÃO REFERENTE À EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>CHK1</i> EM AMOSTRAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS.....	35
FIGURA 6 - GRÁFICO DE DISPERSÃO REFERENTE À EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>CHK1</i> EM TUMORES COM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METÁSTASE.	36
FIGURA 7 - GRÁFICO DE DISPERSÃO REFERENTE À EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>CHK1</i> EM TUMORES COM GRAU I/II E GRAU III.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2012 DO NÚMERO DE NOVOS CASOS DE CÂNCER NO BRASIL, DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA*.....	15
TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	28
TABELA 3 - SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA OS GENES DE REFERÊNCIA E ALVO.....	29
TABELA 4 - EXPRESSÃO RELATIVA DO <i>CHK1</i> mRNA EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA E TECIDO NÃO TUMORAL..	34
TABELA 5 - EXPRESSÃO RELATIVA DO <i>CHK1</i> mRNA, DE ACORDO COM TUMORES COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE.....	35
TABELA 6 - EXPRESSÃO RELATIVA DO <i>CHK1</i> mRNA EM TUMORES DE GRAU I/II E GRAU III.....	36

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SISTEMA TNM: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS TUMORES DE MAMA	12
QUADRO 2 – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE qRT-PCR.....	30
QUADRO 3 - GENES DE REFERÊNCIA CANDIDATOS INCLUÍDOS NO CARTÃO <i>TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL</i>	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ESTRUTURA NORMAL DA MAMA	10
1.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA	11
1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO	13
1.4 EPIDEMIOLOGIA DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS	14
1.5 FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NO CÂNCER	16
1.6 VIAS DE REPARO DO DNA E O CÂNCER DE MAMA	19
1.7 ATIVAÇÃO DE ATM E ATR EM CONSEQUÊNCIA A DANOS AO DNA	20
1.8 <i>CHK1</i> E O CONTROLE DO CICLO CELULAR	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 COLETA DO MATERIAL	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	26
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E RETROTRANSCRIÇÃO	28
4.4 SELEÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	29
4.5 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE qRT-PCR	30
4.6 SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA	30
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	33
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURA NORMAL DA MAMA

A mama é formada por dois componentes principais, a porção glandular, que está envolvida na produção e no transporte do leite, e estroma, formado por tecidos conectivos (HONDERMARCK, 2003). A região glandular da mama (FIGURA 1) tem cerca de 15 – 20 lobos, apresentando em seu interior muitos lóbulos. Tais lóbulos são ligados através de pequenos tubos chamados ductos que se direcionam ao mamilo. As células que formam os ductos e lóbulos são do tipo epitelial secretor (parênquima), responsável por produzir e secretar os constituintes do leite (NANDI, 1995). As células epiteliais são delimitadas por uma camada de células mioepiteliais ligadas à membrana basal, com a função de manter a estrutura tubular dos ductos e lóbulos (HONDERMARCK, 2003). Circundando os lóbulos e ductos estão os fibroblastos com abundante matriz extracelular, além de vasos sanguíneos e de linfa que irrigam a glândula mamária.

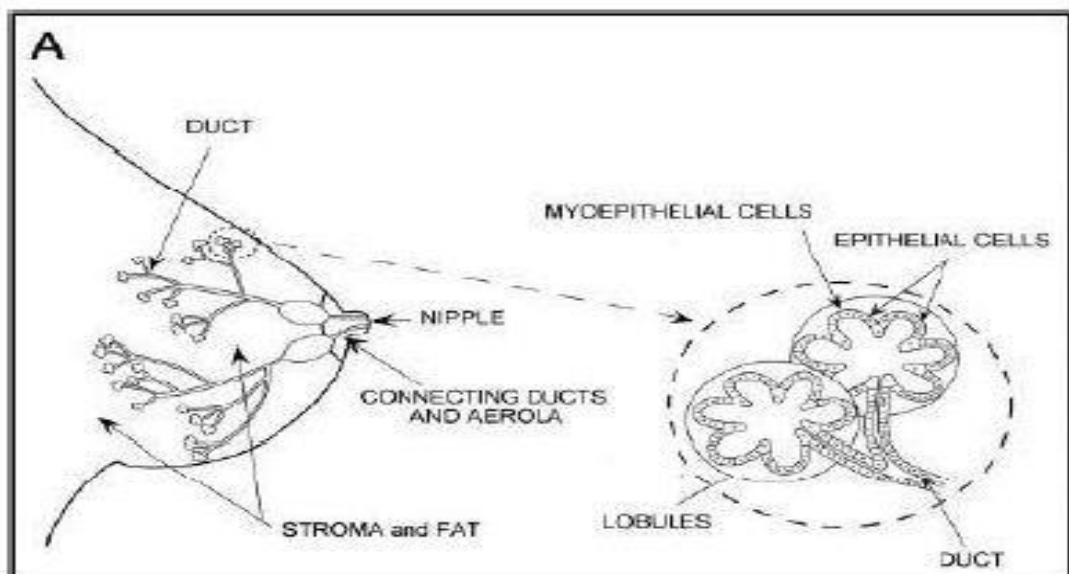


FIGURA 1 – ESQUEMA ANATÔMICO DA MAMA FEMININA

FONTE: Hondermarck (2003)

A mama sofre mudanças cíclicas que são reguladas pelo ciclo menstrual sendo estimulada por hormônios (estrogênio e progesterona) e os processos de gestação e parto. As células epiteliais precisam receber determinados sinais dos hormônios estrogênio e progesterona e com o início da gravidez, a mama assume sua maturação morfológica e funcional completa (HONDERMARCK, 2003). Para que as células epiteliais possam produzir leite, elas são convertidas em estruturas lóbuloalveolar através da morfogênese, envolvendo proliferação celular e diferenciação. O aumento das células epiteliais ocorre constantemente, sendo estimulada pelo estrogênio durante o ciclo menstrual e a gravidez. Após o parto, ocorre diferenciação das células epiteliais, sendo produzida alta quantidade de leite durante o período de lactação. Após o desmame, ocorre um remodelamento do tecido através da morte celular programada (HONDERMARCK, 2003).

1.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

Mais de 95% dos cânceres de mama são de origem epitelial, embora haja diversos tipos histológicos (TOMASKOVIK-CROOK; THOMPSON; THIERY, 2009).

Na maioria dos casos de neoplasias mamárias o início da proliferação celular ocorre em células do revestimento dos ductos e lóbulos mamários, sendo denominados carcinomas ductais e carcinomas lobulares. Há ainda outros tumores de mama menos frequentes, como os mucinosos, medulares, tubulares, papilares (GUIMARÃES, 2008). As primeiras lesões visíveis são as hiperplasias das células epiteliais, que passam a apresentar alterações estruturais, mas não atipia citológica, e poucas alterações genéticas. Conforme a doença progride para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), a atipia torna-se mais proeminente, aumentando significativamente a taxa mitótica e as alterações genéticas. O que diferencia a forma pré-maligna (CIS) da maligna, carcinoma invasivo (CI) é o rompimento da membrana basal pelas células epiteliais (FIGURA 2), ocorrendo a invasão do estroma circundante (TLSTY *et al.*, 2004).

A progressão desta doença é muito variável e nem todos os carcinomas *in situ* evoluem para o carcinoma invasivo, no entanto, o risco de invasão aumenta em mulheres que apresentam um CIS primário (EHEMAN *et al.*, 2009).

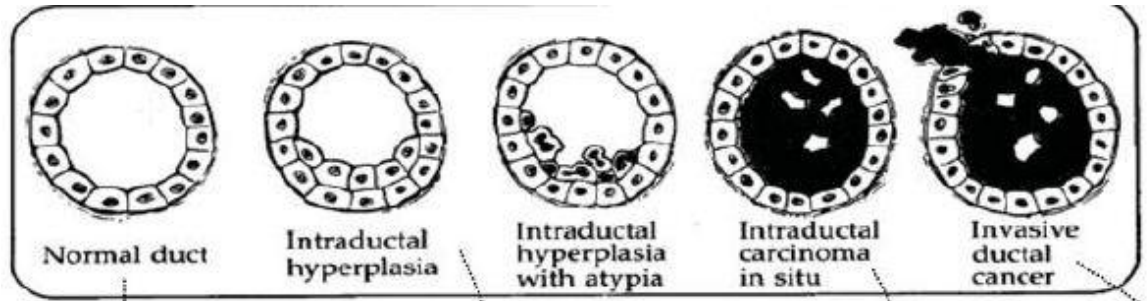


FIGURA 2 - ESTÁGIOS DO CÂNCER DE MAMA

FONTE - TLSTY *ET AL.*, (2004)

LEGENDA: Esquema ilustrando um ducto mamário normal em que suas células sofreram hiperplasia e atipia, formando um carcinoma *in situ* que progride para um carcinoma ductal invasivo.

Os carcinomas ductais invasivos (CDI) apresentam maior frequência, compreendendo 65% a 80% dos casos de câncer de mama. O Carcinoma lobular invasor (CLI) tem incidência de aproximadamente 10% de todos os casos de câncer de mama (EHEMAN *et al.*, 2009).

A classificação dos tumores malignos utiliza o sistema TNM (QUADRO 1) que avalia a doença em três categorias, onde T refere-se à extensão do tumor primário, N referente à ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais e M à ausência ou presença de metástase à distância. São adicionados números a estes a essas categorias para indicar a extensão da doença (T0, T1, T2, T3, T4, T4a, T4b, T4d, N0, N1, N2, N3, N3a, N3b, m0, M1, etc.). Em casos de tumores primários sincrônicos em uma mesma mama, o tumor com maior extensão deve ser usado para a classificação. Este sistema segue os padrões da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC, 2010).

QUADRO 1 - SISTEMA TNM: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS TUMORES DE MAMA UICC/AJCC

T – Tumor primário
Tx – O tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidência de tumor primário

Tis – Carcinoma *in situ*

T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão (dividido em T1mic, T1a, T1b e T1c, conforme o tamanho)

T2 - Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão T3 - Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão

T4 - Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele (dividido em T4a, b, c, d)

N – Linfonodos regionais

NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral (ais), móvel(eis)

N2 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es) (dividido em N2a e N2b)

N3 - Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral

M – Metástase a distância

MX - A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 - Ausência de metástase à distância

M1 - Metástase à distância (seguida da notação conforme a localização da metástase)

FONTE: adaptado de *TNM – Classification of Malignant Tumours* 7º ed, 2010.
http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=14296&Itemid=428

1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO

A diversidade de expressão gênica de tumores mamários pode estar associada com a sua diversidade fenotípica. PEROU *et al.* (2000),

analisaram o padrão de expressão gênica de tumores mamários de 42 indivíduos, sendo 36 de carcinomas ductais invasivos, 2 carcinomas lobular, 1 carcinoma ductal *in situ*, 1 fibroadenoma e 3 amostras de tecido mamário normal. Foram analisados primeiramente 1.753 genes, revelando diferenças entre os tumores, variação na taxa de crescimento, na atividade de sinalizadores de determinadas vias e na composição dos tumores. A expressão desse grupo de genes variou largamente entre as amostras tumorais, sendo bem correlacionadas com o índice mitótico. A classificação sugerida por PEROU *et al.* (2000) baseia-se em quatro grupos: luminal, basal, *HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)* positivo e “*normal like*”. SORLIE *et al.* (2001 e 2003) validaram os dados iniciais de PEROU *et al.* (2000) subdividindo o grupo do luminal em luminal A, luminal B e luminal C. O subtipo luminal A tem maior expressão de receptores de estrogênio e genes regulados por tais receptores e está associado a um melhor prognóstico e maior sobrevida dos pacientes. Luminal B também apresenta receptores de estrogênio. A superexpressão da oncoproteína HER2 é um fator prognóstico bem estabelecido e está associado à baixa sobrevida em tumores mamários, também observado para o grupo HER2+. Nos tumores basais foi observada associação de menor sobrevida e alta frequência de mutações no gene *TP53* (SORLIE *et al.*, 2001 e 2003).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre a população feminina mundial, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A maioria das mortes por esta doença ocorre em países de baixa e média renda, pelo fato das pacientes serem diagnosticadas em estágios avançados da patologia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Em todo o mundo, mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama por ano e cerca de 410.000 devem ir ao óbito devido à doença (COUGHLIN; EKWUEME, 2009).

Dados recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam que para o ano de 2012 é esperado no Brasil uma incidência de 52.680 novos

casos de câncer de mama (TABELA 1), com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Desconsiderando tumores de pele não melanoma, o câncer de mama se torna o mais freqüente nas mulheres da região Sudeste (69/100 mil), Sul (65/100 mil), Centro-Oeste (48/100 mil) e Nordeste (32/100 mil), já na região Norte é o segundo mais incidente (19/100 mil) (INCA, 2012).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
Todas as Neoplasias	257.870	267,99	66.400	318,79	260.640	259,86	75.180	323,22

TABELA 1 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2012 DO NÚMERO DE NOVOS CASOS DE CÂNCER NO BRASIL, DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA*

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

FONTE: Instituto Nacional de Câncer – INCA (2012)

Dentre os sintomas dessa neoplasia, o mais comum é o aparecimento de nódulo, normalmente indolor, com consistência dura e irregular, mas há outros com aspectos globosos e bem definidos. Há ainda outros sinais que podem indicar a doença, como edemas cutâneos semelhantes com a casca da laranja, dor, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo (INCA, 2012).

Quando diagnosticado e tratado precocemente, o câncer de mama apresenta um prognóstico bom. Apesar disso, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, provavelmente porque a doença continua sendo diagnosticada em estágios avançados. Em países desenvolvidos, a sobrevivência média após cinco anos está em torno de 85%, enquanto nos países em desenvolvimento, a sobrevivência fica em torno de 60% (INCA, 2012).

As causas que levam ao câncer de mama ainda não são totalmente conhecidas. No entanto, alguns fatores estão relacionados à susceptibilidade. A história familiar é um fator importante principalmente em tratando de parentes de primeiro grau antes dos 50 anos, podendo indicar predisposição genética associada a mutações em genes específicos. No entanto, o câncer de mama de fator hereditário corresponde a cerca de 5-10% do total de casos. Há ainda fatores relacionados à exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos. Aspectos endócrinos relacionados ao estímulo do estrogênio, seja ele endógeno ou exógeno, tendo o risco aumentado de acordo com o tempo de exposição, aparentemente são fatores de risco para o câncer de mama. Menarca precoce (antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (após os 50 anos de idade), nuliparidade e terapia de reposição hormonal são também considerados fatores de risco (INCA, 2012).

Estratégias de prevenção e detecção precoce são ferramentas de grande importância para a redução da mortalidade decorrente do câncer de mama (CHUN *et al.*, 2009).

Estudos envolvendo aspectos epidemiológicos com o auxílio de metodologias moleculares têm fornecido importantes informações para uma melhor compreensão da doença. Os resultados oriundos desses estudos colaboram para a identificação de novos alvos, tanto para a prevenção quanto para o procedimento terapêutico (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

1.5 FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NO CÂNCER

O câncer de mama é a consequência de um processo de várias etapas, resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em uma

população de células (NUSSBAUM, 2008). Trata-se de uma doença heterogênea que apresenta variações histopatológicas e genéticas. Com isso, não se deve esperar modelos individuais para se entender completamente a doença, e sim como forma de auxiliar na investigação da melhor maneira de compreender doenças heterogêneas (VARGO-GORGOLA; ROSEN, 2007).

O acúmulo de erros genéticos e epigenéticos pode transformar células normais em células tumorais metastáticas. Alterações nos padrões de metilação de ilhas CpG que ocorrem em regiões promotoras de genes supressores de tumor alteram a expressão de genes associados ao câncer, contribuindo para o silenciamento transcricional, estando envolvidas na progressão de neoplasias. A hipometilação do DNA pode ativar oncogenes e causar instabilidade cromossômica, ao passo que a hipermetilação do DNA pode silenciar genes supressores tumorais, fatores estes que resultam na desregulação da proliferação celular, seleção clonal e formação do tumor, ou seja, interferem na estabilidade genômica através da ruptura dos mecanismos de controle (RODENHISER; MANN, 2006).

A formação e progressão tumoral se dão através de alterações que ocorrem em duas classes principais de genes que atuam no ciclo celular, sendo eles os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (OSBORNE *et al.*, 2004).

Os proto-oncogenes podem ser transformados em oncogenes ao sofrerem mutações e passam a apresentar ganho de função ou expressão aumentada. Translocações cromossômicas, ampliações gênicas e mutações de ponto são fatores que podem levar um proto-oncogene a se tornar oncogene, sendo necessário apenas um alelo apresentar a alteração para que a célula passe do estado normal para maligno (KNUDSON, 1985).

Diversos oncogenes apresentam características heterogêneas, estando associados a cânceres em humanos, tais como, *HRAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR*, *ERBB2*, *BCL2*, *ABL1* e *MDM2* (KOPNIN, 2000). Em neoplasia de mama, o sistema de sinalização em cascata do *ERBB2* está associado com a progressão desta neoplasia (OSBORNE *et al.*, 2004).

A superexpressão do oncogene *ERBB2* está envolvido com a formação de dímeros, aumentando a transdução de sinal através da

fosforilação e desfosforilação de proteínas intermediárias e intracelulares, associadas com a proliferação e sobrevivência da célula (ROSS *et al.*, 2009).

Os genes supressores de tumor atuam com a finalidade de impedir a progressão do ciclo celular em caso de dano no DNA, através de proteínas regulatórias (OSBORNE *et al.*, 2004). Mutações nestes genes levam a célula a uma proliferação desordenada ao impedir a checagem do ciclo celular e possível reparo do dano (WEINBERG, 1991).

Mutações genéticas herdadas podem aumentar a predisposição ao câncer de mama. Cerca de 5-10% de todos os cânceres de mama são ocasionados por mutação em determinados genes de susceptibilidade em células germinativas. Estes podem ser divididos em duas classes: “alto risco” compreendendo principalmente os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *LKB1/STK11* e *CDH1* e os de “baixo a moderado risco”, como o *CHK2*, *TGFB1*, *CASP8* e *ATM* (OLDENBURG, 2007). Ao todo, esses genes são responsáveis por menos de 25% dos casos de tumores de mama hereditários, indicando que deve haver diversos outros genes ainda desconhecidos envolvidos no câncer de mama (BRADBURY; OLOPADE, 2007).

Os genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* são considerados genes *caretakers*, atuando como sensores nas situações de dano ao DNA e participando diretamente em processos de reparo. O gene *BRCA1* está localizado no cromossomo 17q21 e o *BRCA2* no 13q12. Alterações nesses genes permitem que erros se acumulem e levam a uma instabilidade genética, favorecendo o surgimento de tumores. Em famílias onde há múltiplos casos de câncer de mama, o risco acumulado do aparecimento da doença aos 70 anos de idade é de 85% para indivíduos com mutação em *BRCA1* e 84% para *BRCA2* (OLDENBURG *et al.*, 2007).

O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17p13.1 e codifica uma proteína envolvida em diversas vias celulares que controlam a proliferação celular, tal como o ciclo celular, apoptose e o reparo do DNA. A expressão do gene ocorre em resposta a vários sinais de estresse. Mutações germinativas em *TP53* são muito raras, menos de 400 famílias em todo o mundo foram descritas. Mutações somáticas em *TP53* são relatadas em 20-60% dos cânceres de mama (OLDENBURG *et al.*, 2007).

O gene *CHK2* está localizado no cromossomo 22q12.1 e é responsável pela checagem da fase G2 do ciclo celular tendo um importante papel no reparo do DNA, sendo ativado em resposta à radiação ionizante através da fosforilação da proteína ATM (*ataxia telangiectasia mutated*). A ativação do gene *CHK2* ativa outras proteínas do ciclo celular, incluindo BRCA1 e p53 (OLDENBURG *et al.*, 2007).

1.6 VIAS DE REPARO DO DNA E O CÂNCER DE MAMA

Diversas vias de reparo atuam de acordo com tipos específicos de danos no DNA. As vias incluem o reparo por excisão de bases (*BER*), reparo por excisão de nucleotídeos (*NER*), reparo de mal-pareamento (*MMR*) e o reparo por quebras de fita dupla no DNA (DSBs) tanto por recombinação homóloga (*HR*) quanto por junção terminal não homóloga (*NHEJ*) (DALHUS *et al.*, 2009).

O reparo por excisão de bases atua reconhecendo e removendo danos no DNA, como bases oxidadas ou reduzidas que muitas vezes são causadas por mutagênicos. Nesse processo a base danificada é removida pela ação da enzima DNA glicosilase e ocorre a formação de um sítio apurínico ou apirimidínico que é processado por uma endonuclease gerando quebra de fita. A substituição da base danificada ocorre pela ação de enzimas polimerases e ligases (DAMIA; D'INCALCI, 2007).

A via de reparo por excisão de nucleotídeos apresenta diversos passos, iniciando pelo reconhecimento da lesão no DNA e em seguida recrutando o complexo de reparo, ação da helicase, incisão na fita em cada lado da região danificada, liberando um fragmento com cerca de 24-32 nucleotídeos, preenchimento da falha e por fim a ligação do novo fragmento sintetizado (HANAWALT, 2002).

O reparo de mal-pareamento remove erros de DNA recém sintetizados. Essa via é particularmente eficiente no reconhecimento de mal-pareamento base-base, inserções e deleções. Falha nessa via é responsável por fenótipos mutantes e predispõe ao câncer (DAMIA; D'INCALCI, 2007).

As quebras de fita dupla comumente são consideradas as lesões mais graves do DNA. Podem ser ocasionadas por radiação ionizante, radicais livres e diversos outros agentes ou mesmo quando a forquilha de replicação encontra uma quebra de fita simples. Essa via pode agir de duas maneiras, a via de reparo livre de erros através da recombinação homóloga (*HR*) ou pela via propensa a erro (*NHEJ*). Na recombinação homóloga, o reparo ocorre através do alinhamento da sequência com a sua equivalente na cromátide irmã, sendo mediada pela proteína RAD52. A via do *NHEJ* é a principal rota de reparo para quebra de dupla fita na fase G0/G1 do ciclo celular, através da ligação direta das duas fitas duplas a partir da quebra, estando propensa ao erro (DAMIA; D'INCALCI, 2007).

1.7 ATIVAÇÃO DE ATM E ATR EM CONSEQUÊNCIA A DANOS AO DNA

Ataxia telangiectasia (AT) é uma doença autossômica recessiva, caracterizada por apresentar diversos fenótipos, incluindo degeneração neuronal, telangiectasia óculocutânea, disfunção imune, predisposição ao câncer e envelhecimento precoce. Células de pacientes que apresentam AT exibem uma variedade anormal de respostas para a radiação ionizante, como alterações nos pontos de checagem de G1, S e G2 do ciclo celular e radiosensibilidade com um aumento de quebras cromossômicas e fusões de telômeros (KIM *et al.*, 1999).

ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) são proteínas de alto peso molecular, sendo compostas por 3.056 e 2.644 aminoácidos respectivamente. Ambas apresentam domínio catalítico de aproximadamente 300 aminoácidos em sua extremidade carboxi terminal. Ainda não está totalmente claro como estas duas proteínas quinases são ativadas em consequências aos danos ao DNA (YANG *et al.*, 2004).

Diversos mecanismos foram propostos para explicar a ativação de ATM e ATR através de dano ao DNA, como interação direta através da interação com DNA danificado; outro mecanismo proposto é a ativação indireta através da interação com proteínas de reparo ou manutenção do

DNA; um terceiro mecanismo de como essa ativação se dá inclui a combinação dos outros dois mecanismos. Alguns dados experimentais sugerem que o terceiro mecanismo seja o mais provável, sendo estas proteínas ativadas através da interação com o DNA e membros dos complexos de reparo. Estudos verificaram que danos ao DNA estimulam a atividade quinase da ATR para um nível significativamente maior quando comparado ao DNA sem sofrer danos. ATM e ATR interagem com muitas proteínas (GUO *et al.*, 2000) sendo demonstrado através de estudos que ATR regula a fosforilação de CHK1 em resposta a danos ao DNA (LIU *et al.*, 2000).

1.8 *CHK1* E O CONTROLE DO CICLO CELULAR

O gene *CHK1* foi mapeado na região 11q24.2 e está envolvido em mecanismos que preservam a integridade do genoma durante o ciclo normal das células. Sua localização cromossômica é adjacente à do gene *ATM*, que está mapeado na região 11q23, que frequentemente apresenta deleção e LOH (perda da heterozigosidade) em cânceres humanos como o de mama, ovário e pulmão (CARRASSA; DAMIA, 2011). A perda de mecanismos envolvidos na integridade do DNA pode levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer (SORENSEN; SYLJUASEN, 2011). A proteína ATR age em resposta a danos ocorridos no DNA fosforilando resíduos de serina ou treonina quando são seguidos por uma glutamina. A fosforilação do CHK1 ocorre na serina 317 e serina 345 em resposta à radiação ionizante, radiação ultravioleta e hidroxiuréia, ativando o ponto de checagem do ciclo celular em S e G2. Em seguida, CHK1 fosforila CDC25A (*cell division cycle 25 homolog A*) para que seja ubiquitinado. Na ausência da proteína CDC25A, o complexo CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*) /ciclina E/A é inativado e a fase S do ciclo celular é atrasada (FIGURA 3) (R&D SYSTEMS®, 2003; MEUTH, 2010; SORENSEN; SYLJUASEN, 2011). Quando o gene *CHK1* é ativado em resposta a estresse ao DNA ocasionado na fase G2, CHK1 fosforila CDC25C (*M-phase inducer phosphatase 3*) que será sequestrado pelo citoplasma e em

sua ausência as proteínas CDC2 e a ciclina B1 são inativadas e a fase G2 do ciclo celular é parada (FIGURA 03) (R&D SYSTEMS®, 2003).

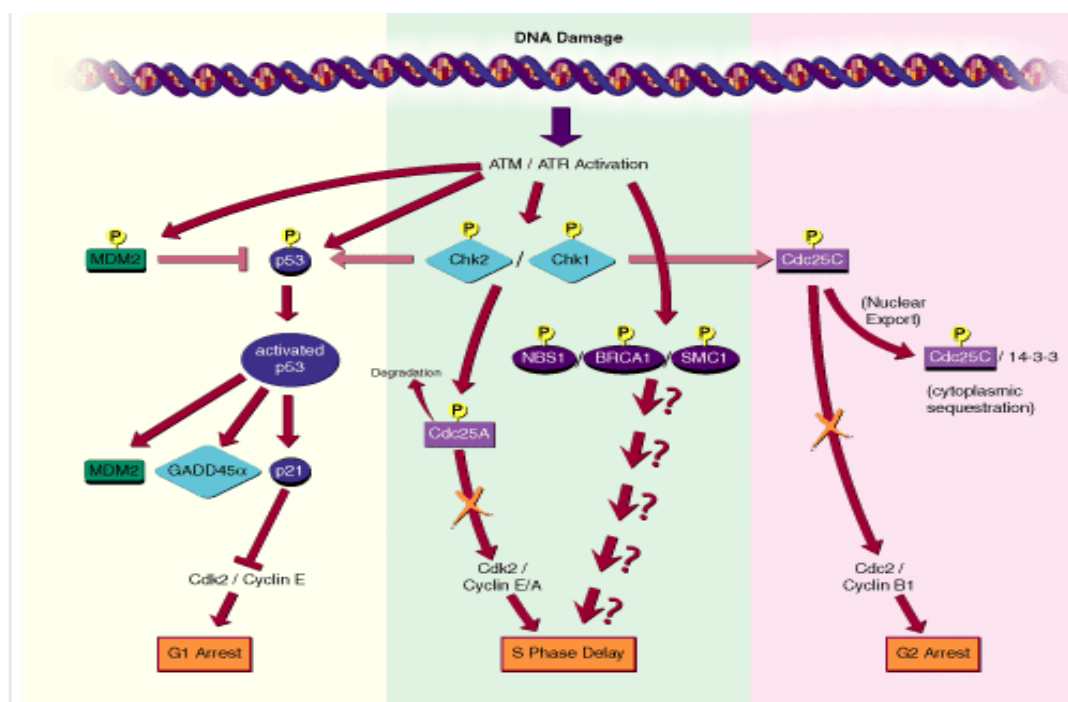


FIGURA 3 - VIA DE ATUAÇÃO DO *CHK1* NOS PROCESSOS DO CICLO CELULAR
 FONTE: R&D SYSTEMS, 2003.

Carrassa e Damia (2011) observaram que a diminuição de CHK1 por inibidores ou por RNA de interferência levou a um aumento de iniciação da replicação do DNA, aumento das quebras de fitas do DNA além de fosforilação de H2AX (*H2A histone Family*) em células U2OS (*Human Bone Osteosarcoma Cells*), tais alterações levam a erros durante a mitose levando a célula à morte.

A proteína CHK1 é necessária para o crescimento normal das células, especificamente nas fases S e M. Durante a fase S, CHK1 mantém as taxas normais de replicação, minimizando falhas durante a mitose. A inibição de CHK1 leva ao acúmulo de CDC25A, ativando CDK2 aumentando a taxa de replicação celular. Uma fração de CHK1 está localizada no centrossoma durante a intérfase, estando responsável por regular negativamente CDC25B, prevenindo que o complexo CDK1/CiclinaB1 seja ativado prematuramente (CARASSA; DAMIA, 2011).

Guertin *et al.* (2012) demonstraram que a combinação do inibidor MK-8776 de CHK1 e do inibidor MK-1775 de WEE1 (*Wee1-like protein kinase*) resulta na inibição da proliferação celular em diversas linhagens celulares.

A nível transcricional e pós-transcricional, taxas elevadas de CHK1 foram encontradas em alguns tumores humanos, entre eles, carcinoma de cólon e câncer de mama triplo negativo, com simultânea expressão elevada de E2F1 (CARRASSA; DAMIA, 2011).

CHK1 apresenta um papel na regulação transcricional, agindo como um repressor de transcrição. CHK1 se liga à cromatina e fosforila H3-T11 (H3-treonina11), em condições fisiológicas normais. Em caso de danos ao DNA, CHK1 se dissocia da cromatina, ocasionando a redução da fosforilação da H3-T11 e a redução da ligação da histona acetiltransferase GCN5 aos promotores de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, como CDK1 e ciclina B, levando a uma redução da transcrição desses genes.

Estudos recentes investigam formas de inibição do gene *CHK1* como aplicação terapêutica, uma vez que com o bloqueio de sua ação, agentes apoptóticos como radioterápicos terão maior eficácia. Por outro lado, a inibição do *CHK1* causa uma grande instabilidade cromossômica e afeta fortemente a viabilidade nas divisões celulares. Estudos com camundongos têm demonstrado que a interrupção específica do *CHK1* em células adultas aumentou a taxa de apoptose e também os defeitos de desenvolvimento (MEUTH, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo e estimativas para os próximos anos indicam um aumento no número de novos casos da doença. Por se tratar de uma doença complexa, não há ainda um completo entendimento e o desenvolvimento de modelos se tornam mais difíceis.

Nesse âmbito, métodos utilizando análises de expressão de determinados genes envolvidos nos processos que levam à carcinogênese são de grande relevância. Estudos têm demonstrado que alterações no gene *CHK1* estão intimamente relacionadas com a progressão tumoral, e também com a resposta a determinados agentes terapêuticos. Como está envolvido em vias de reparo de danos, a integridade de *CHK1* pode diminuir o nível de resposta a drogas que utilizam a via de reparo na qual esta proteína atua, justificando as pesquisas que visam a sua inibição como estratégia terapêutica. Neste projeto pretende-se caracterizar a expressão deste gene em um grupo de carcinomas mamários para avaliar se estes poderão se beneficiar desta estratégia.

Os resultados desse projeto podem contribuir para a identificação de novos alvos para terapias mais específicas, auxiliando na redução da morbidade e mortalidade da população.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de expressão do gene *CHK1* em carcinomas mamários esporádicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do gene *CHK1* no nível de RNAm em tumores primários.
- Correlacionar o nível de expressão gênica com os parâmetros clínicos e histopatológicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG. Cada paciente recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

As amostras de carcinomas mamários são rotineiramente coletadas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) e no Hospital de Clínicas (HC) da UFPR, Curitiba, Paraná.

As amostras não tumorais da mama contralateral de pacientes com câncer de mama foram obtidas durante a cirurgia de remoção do tumor daquelas pacientes que necessitaram mamoplastia corretora e foram utilizadas como controle.

Neste trabalho, foram utilizadas 34 amostras de tumor primário e oito amostras de tecido não tumoral da mama contralateral, coletadas no momento da cirurgia e imediatamente alocadas em *RNAlater*® (*Ambion Inc. Applied Biosystems*) para a preservação do RNA. A (TABELA 2) apresenta as características das amostras deste estudo referentes ao quadro clínico e histopatológico.

As amostras foram processadas para a remoção de tecido adiposo, tecido estromal e vasos sanguíneos, utilizando tesouras e pinças esterilizadas e placas de Petri descartáveis. O material foi estocado em tubos do tipo *Eppendorf* e mantido a -80°C até o momento da extração de RNA.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

	IDADE	DIAGNÓSTICO	L	G	T	ER	PR	ERBB2
1	56	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a carcinoma ductal in situ comedocarcinoma, com necrose	P	II	37	-	-	-

2	33	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	40	POS	POS	NEG
3	44	Carcinoma Ductal Invasor Bilateral (D)	P	II	50	POS	POS	NEG
4	56	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Intraductal solido e cibriforme	A	II	27	POS	POS	NEG(1+)
5	62	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	15	NEG	NEG	NEG
6	72	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	35	POS	POS	POS(2+)
7	67	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	5	POS	POS	NEG(1+)
8	66	Carcinoma Ductal Invasor com Recidiva	P	I	20	POS	POS	POS (2+)
9	67	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	P	III	50	POS	POS	NEG (1+)
10	35	Carcinoma Ductal Medular	P	III	-	POS	POS	NEG
11	44	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	18	POS	POS	NEG
12	57	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	20	POS	POS	POS(3+)
13	72	Carcinoma Ductal Invasor associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	A	II	24	POS	POS	NEG
14	45	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	23	POS	POS	NEG (1+)
15	48	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Ductal in situ	A	III	23	NEG	NEG	NEG
16	45	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	5	POS	POS	POS (3+)
17	86	Carcinoma Ductal Invasor associado a CDIS padrao sólido	A	III	30	POS	POS	NEG
18	83	Carcinoma Ductal Invasor Apócrino, Carcinoma "in situ" tipo comedo e cibriforme	A	II	8	POS	NEG	NEG
19	46	Carcinoma Ductal	A	I	17	POS	POS	NEG
20	49	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	40	POS	POS	NEG
21	71	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	10	POS	POS	NEG
22	74	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	35	NEG	POS	NEG(2+)
23	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	20	POS	POS	NEG (1+)
24	73	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	32	POS	POS	NEG

25	46	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Ductal <i>in situ</i> sólido cibriforme	P	III	40	POS	POS	NEG
26	39	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	18	POS	POS	NEG
27	49	Carcinoma Mamário Invasor Multifocal, a maior lesão sendo CDI associado a carcinoma micropapilar invasor	P	III	60	POS	POS	NEG(+1)
28	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	60	NEG	NEG	POS(2+)
29	39	Carcinoma Ductal Invasor SOE associados a Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	P	II	80	NEG	NEG	-
30	61	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	20	POS	POS	NEG
31	84	Carcinoma Ductal Invasor; comedocarcinoma	P	III	35	NEG	NEH	POS(3+)
32	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	40	POS	POS	NEG
33	58	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	17	POS	POS	NEG
34	42	Carcinoma Ductal Invasor; associado a carcinoma <i>in situ</i> cibriforme	A	II	32	NEG	POS	NEG (2+)

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA, COM IDADE, DIAGNÓSTICO, INDICAÇÃO DE PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS, GRAU HISTOLÓGICO E TAMANHO DO TUMOR E INDICAÇÃO DO *STATUS* DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO, PROGESTERONA E DO ERBB2.

FONTE: O Autor (2013)

LEGENDA: **IDADE**. Idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **SOE**, sem outra especificação; **L**, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; **P**, presença; **A**, ausência; **G**, grau do tumor, **T**, tamanho do tumor em mm, **ER**, *status* do receptor de estrogênio, **PR**, *status* do receptor de progesterona, **ERBB2**, amplificação do oncogene *ERBB2*, **POS**, positivo, **NEG**, negativo.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E RETROTRANSCRIÇÃO

A extração de RNA total de ambas as amostras foi realizada com o *kit* de extração de RNA *RNAeasy*® (*Qiagen*), seguido de tratamento com DNase e posteriormente estocados a -80°C. Aproximadamente 200 ng dos RNAs obtidos foram aplicados em gel de agarose 2,0% e corados com brometo de etídeo, para análise da integridade. Um RNA íntegro apresenta duas bandas, referentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S. Para determinar as concentrações de RNA, foi utilizado o equipamento Nanodrop® 2000. A

retrotranscrição de 1200ng de RNA foi realizada com o *RT High Capacity cDNA Retrotranscription Kit®* (Applied Biosystem).

4.4 SELEÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram obtidas de acordo com os parâmetros descritos em 2010 por Taylor *et al.*, onde o conteúdo de GC deve estar entre 50% e 60%, as sequências alvo apresentando entre 75 e 150 pares de bases e a temperatura de *melting* entre 55 e 65 °C. As sequências do gene alvo e dos genes de referência contemplando as regiões de junções de exons foram obtidas a partir do banco de dados *Ensembl Genome Browser* (Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>), e os parâmetros analisados através do software *Oligo Analyzer* (Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) (TABELA 03).

GENE	DIREÇÃO	SEQUÊNCIA	TAMANHO	Tm °C
CHK1	<i>Forward</i>	5' AGGGATCAGCTTTTCCCAGCCCA	97	63,0°C
CHK1	<i>Reverse</i>	5' CCGCTGCCAGGGGTCTGTG		63,6°C
ACTB	<i>Forward</i>	5' GATGCAGAAGGAGATCACTGC	77	55,6°C
ACTB	<i>Reverse</i>	5' AGTACTTGCGCTCAGGAGGA		58,0°C
B2M	<i>Forward</i>	5' TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA	75	56,3°C
B2M	<i>Reverse</i>	5' CGGCATCTTCAAACCTCCA		55,2°C

TABELA 3 - SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA OS GENES DE REFERÊNCIA E ALVO

4.5 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE qRT-PCR

A padronização da reação de qRT-PCR foi realizada utilizando o equipamento *Mastercycler® ep Realplex* para estabelecer o volume total da reação, temperatura de hibridização e concentração dos oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse*. O QUADRO 02 apresenta a reação padronizada que foi utilizada para a os ensaios de expressão gênica.

QUADRO 2 - PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE QRT-PCR

Reagentes	Volume na reação (µl)	Concentração total na reação
Água ultra-pura	2,6	
Iniciador <i>forward</i> (10 pmol/µl)	0,2	2,0 pmol
Iniciador <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	0,2	2,0 pmol
<i>SYBR green PCR Master Mix</i>	5,0	
cDNA (7,5 ng/µl)	2,0	15,0 ng
	Total = 10,0	
Temperatura de hibridização dos iniciadores do gene alvo	O gene <i>CHK1</i> apresentou a temperatura de hibridização de 63,3°C.	
Programa de PCR	2 min a 50 °C 10 min a 95 °C 15 seg a 95 °C e 1 min a 63,3 °C (40 X) Curva de dissociação (pré-programada)	

4.6 SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

Para a utilização dos genes de referência, é necessário que haja uma validação com o intuito de aumentar a confiabilidade em relação às diferenças dos níveis de expressão que são detectados (SORBY *et al.*, 2010).

Genes de referência estáveis para um determinado tipo tumoral não necessariamente serão estáveis em outro tipo (CARADEC; SIRAB; KEUMEUGNI, 2010). Dessa forma, se faz necessário que os genes de referência sejam validados em cada experimento para cada tipo de tecido.

Para a seleção dos genes de referência foi utilizado o cartão microfluídico de 384 poços *Taq Man Low Density Endogenous Control Panel* (TLDA – *Taq Man Low Density Array*) (*Applied Biosystems*), contendo ensaios de expressão para 16 genes de referência normalmente utilizados (QUADRO 03), e comporta cDNA de 8 amostras. Foi adicionado ao cartão *Taq Man Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*) em um volume final de 100 µl. A leitura foi utilizada no aparelho da *Applied Biosystems 7900HT Fast Real time PCR System*, de acordo com o seguinte protocolo de PCR: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 94°C e 40 ciclos de 30 segundos a 97°C, seguidos de 1 minuto a 60°C. Aproximadamente 500 ng de cDNA foram utilizados de 5 amostras de tumores de mama e 3 amostras de tecido não tumoral da mama (contralateral). A placa foi analisada utilizando os softwares *SDS v2.3 for the 7900HT Fast Real Time PCR System* e *RQ Manager v1.2* (*Applied Biosystems*). Os resultados foram analisados no software *DataAssist*[®] v. 3.0 (Disponível em http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/DATAASSIST_SOFTWARE_LOGIN), e estão representados na (FIGURA 4). Os genes candidatos mais estáveis apresentam os menores scores, sendo eles *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB*.

QUADRO 3 - GENES DE REFERENCIA CANDIDATOS INCLUIDOS NO CARTÃO *TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL*.

Nome do Gene	Símbolo	ID	Tamanho (pb)
18S Ribosomal RNA	18S	Hs99999901_s1	187
Phosphoglycerate Kinase-1	PGK1	Hs99999906_m1	75
B-Actin	ACTB	Hs99999903_m1	171
Polymerase (RNA) II polypeptide A	POLR2A	Hs00172187_m1	61
Beta-2-microglobulin	B2M	Hs99999907_m1	75
Peptidyl-prolyl isomerase/ciclophylin A	PPIA	Hs99999904_m1	98

Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1	122
Acidic ribosomal phosphoprotein P0	RPLP0	Hs99999902_m1	105
B-Glucuronidase	GUSB	Hs99999908_m1	81
Transcription factor IID, TATA box binding protein	TBP	Hs99999910_m1	127
Hydromethylbilane synthase	HMBS	Hs00609297_m1	64
Transferrin receptor (p90, CD71)	TFRC	Hs99999911_m1	105
Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase 1	HPRT1	Hs99999909_m1	100
Ubiquitin C	UBC	Hs00824723_m1	71
Importin 8	IPO8	Hs00183533_m1	71
Tyrosine 3 monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	Hs00237047_m1	70

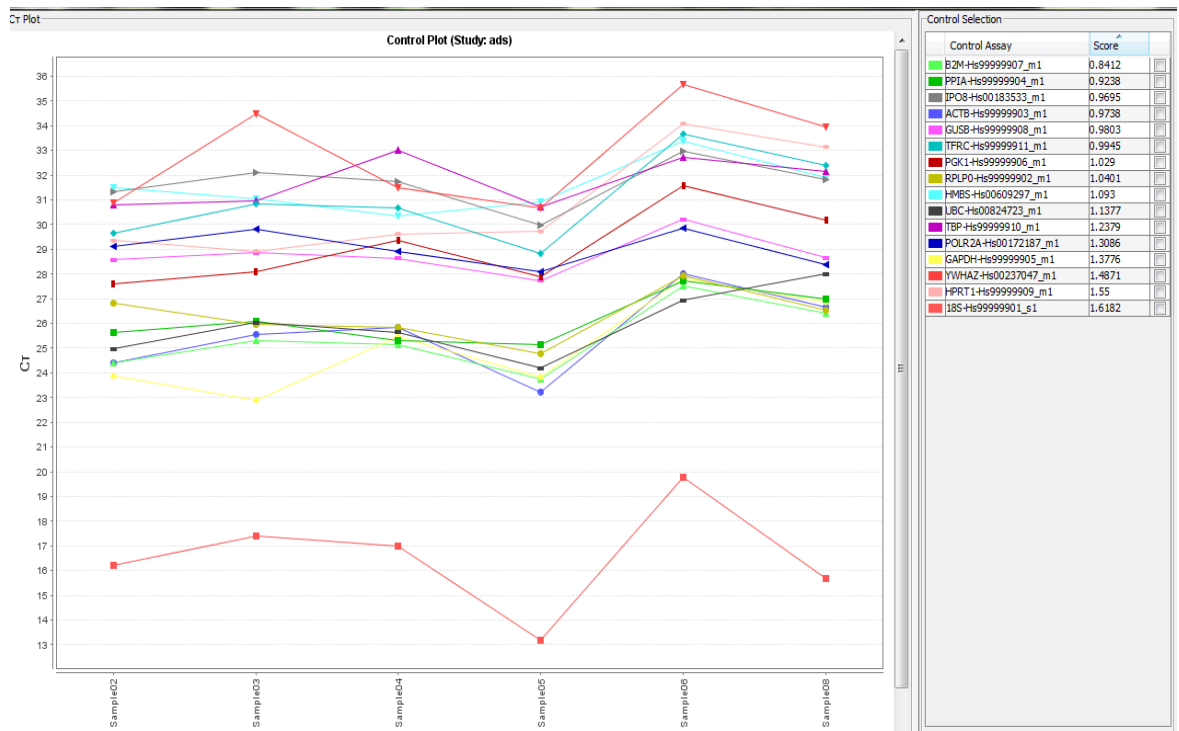


FIGURA 4 - GENES DE REFERÊNCIA INCLuíDOS NO CARTÃO TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL PARA ANÁLISE DE ESTABILIDADE ATRAVÉS DO SOFTWARE DATA ASSIST V.3.0

Os genes de referência que apresentaram maior estabilidade foram *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB*, com scores de 0,8412; 0,9238; 0,9695 e 0,9738 respectivamente. Para a realização do estudo foram utilizados os genes *B2M* e *ACTB*. A sequência dos iniciadores do gene *B2M* foram obtidos a partir do trabalho de FU *et al.*, 2010.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para esta análise foi utilizado o método da quantificação relativa, onde a expressão gênica de um determinado gene alvo é estabelecida em relação a uma amostra de referência. O método é comumente chamado de Quantificação Relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Neste método é realizada a comparação entre a variação do C_t (*Cycle Threshold*) entre dois grupos amostrais, o teste e o controle. Para a obtenção das eficiências e $C_{T's}$ foi utilizado o *software Real-Time PCR Miner*, (Disponível em: <http://www.miner.ewindup.info/Version2>). Foram utilizadas as amostras em que a eficiência média da triplicata apresentava-se entre 0,85 e 1,15.

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no equipamento *RealPlex* (*Eppendorf*) a partir do protocolo *SYBR Green* (*Applied Biosystems*).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados obtidos, foram realizados testes de normalidade entre os grupos amostrais, seguido do teste Mann-Whitney ou teste *t* com correção Welch's através do *software GraphPad Prism version 6.01 para Windows* (Disponível em: www.graphpad.com).

5 RESULTADOS

Foram estudadas 34 amostras de carcinomas primários de mama e oito amostras de tecido não tumoral contralateral. Os C_{T_s} e eficiências dos genes de referência e do gene alvo em ambos os tecidos, tumoral e não tumoral, estão apresentados no ANEXO 2.

Como controle endógeno foram utilizado os genes de referência *ACTB* e *B2M*. A possibilidade de avaliá-los em conjunto foi analisada pelo teste de qui-quadrado de homogeneidade. Para o grupo tumoral, foi obtido o valor $\chi^2_{33} = 0,599$; $p > 0,99$. Para o grupo não tumoral, foi obtido o valor $\chi^2_7 = 0,075$; $p > 0,99$.

Para a análise da expressão gênica, os grupos amostrais foram divididos em: carcinoma ductal invasor e tecido não tumoral da mama contralateral. Foram ainda analisados os grupos relativos à presença ou ausência de metástases e graus histológicos I e II em relação ao grau III.

O nível de expressão relativa do *CHK1* mRNA em carcinomas ductal invasor (n=34) foi de $3,52 \pm 2,52$ e no tecido não tumoral de mama contralateral (n=8) foi de $0,81 \pm 0,42$. A diferença de expressão foi considerada estatisticamente significativa, ($p < 0,0001$), utilizando um nível de confiança de 95% de acordo com o teste Mann Whitney (TABELA 04). Os dados da análise estão expostos na FIGURA 5.

Expressão Relativa <i>Chk1</i> mRNA	
Tumoral (n=34)	Não tumoral (n=8)
$3,52 \pm 2,52$	$0,81 \pm 0,42$
Valor de $p < 0,0001$	

TABELA 4 - EXPRESSÃO RELATIVA DO *CHK1* mRNA EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA E TECIDO NÃO TUMORAL. VALORES REFERENTES À MÉDIA DO $2^{-\Delta\Delta CT}$ COM O DESVIO PADRÃO; ENTRE PARÊNTESES ESTÃO OS NÚMEROS DE AMOSTRAS PARA CADA GRUPO; O VALOR DE p FOI OBTIDO ATRAVÉS DO TESTE MANN WHITNEY.

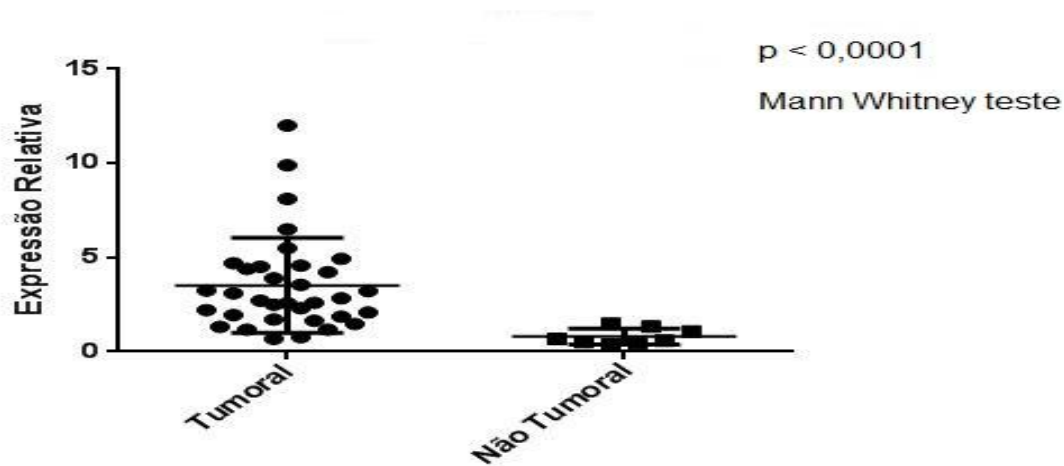


FIGURA 5 - GRÁFICO DE DISPERSÃO REFERENTE À EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *CHK1* EM AMOSTRAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS.

O nível de expressão relativa do gene *CHK1* mRNA em tumores com presença de metástase (n=15) foi de $4,68 \pm 3,21$, enquanto que, em tumores com ausência de metástase (n=19) foi de $2,60 \pm 1,29$. A diferença de expressão foi considerada estatisticamente significativa, ($p = 0,0305$) utilizando um nível de confiança de 95%. Como os dois grupos amostrais demonstraram ter distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado o teste *t* com a correção Welch's para a análise (TABELA 05), cujos dados estão expostos na FIGURA 6.

Expressão Relativa <i>Chk1</i> mRNA	
Presença de metástase (n=15)	Ausência de metástase (n=19)
$4,68 \pm 3,21$	$2,60 \pm 1,29$
Valor de p = 0,0305	

TABELA 5 - EXPRESSÃO RELATIVA DO *CHK1* mRNA, DE ACORDO COM TUMORES COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE. VALORES REFERENTES À MÉDIA DO $2^{-\Delta\Delta CT}$ COM O DESVIÓ PADRÃO; ENTRE PARÊNTESES ESTÃO OS NÚMEROS DE AMOSTRAS PARA CADA GRUPO; O VALOR DE p FOI OBTIDO ATRAVÉS DO TESTE *t* COM A CORREÇÃO WELCH'S.

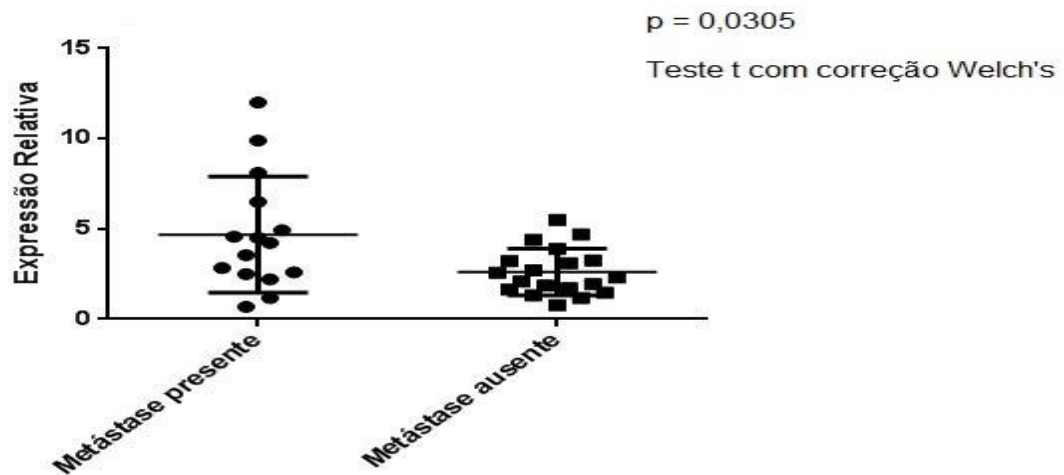


FIGURA 6 - GRÁFICO DE DISPERSÃO REFERENTE À EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *CHK1* EM TUMORES COM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METÁSTASE.

Para os tumores que apresentavam grau I e II ($n=25$), o nível de expressão relativa do gene *CHK1* mRNA foi de $3,02 \pm 2,39$, enquanto que em tumores de grau III ($n=9$) foi de $4,90 \pm 2,48$. A diferença foi considerada estatisticamente significativa ($p = 0,0150$), com um nível de confiança de 95% de acordo com o teste Mann Whitney (TABELA 6). Os dados da análise estão expostos na (FIGURA 7).

Expressão Relativa <i>Chk1</i> mRNA	
Grau I e II ($n=25$)	Grau III ($n=9$)
$3,02 \pm 2,39$	$4,90 \pm 2,48$
Valor de $p = 0,0150$	

TABELA 6 - EXPRESSÃO RELATIVA DO *CHK1* mRNA EM TUMORES DE GRAU I/II E GRAU III. VALORES REFERENTES À MÉDIA DO $2^{-\Delta\Delta CT}$ COM O DESVIO PADRÃO; ENTRE PARÊNTESES ESTÃO OS NÚMEROS DE AMOSTRAS PARA CADA GRUPO; O VALOR DE P FOI OBTIDO ATRAVÉS DO TESTE MANN WHITNEY.

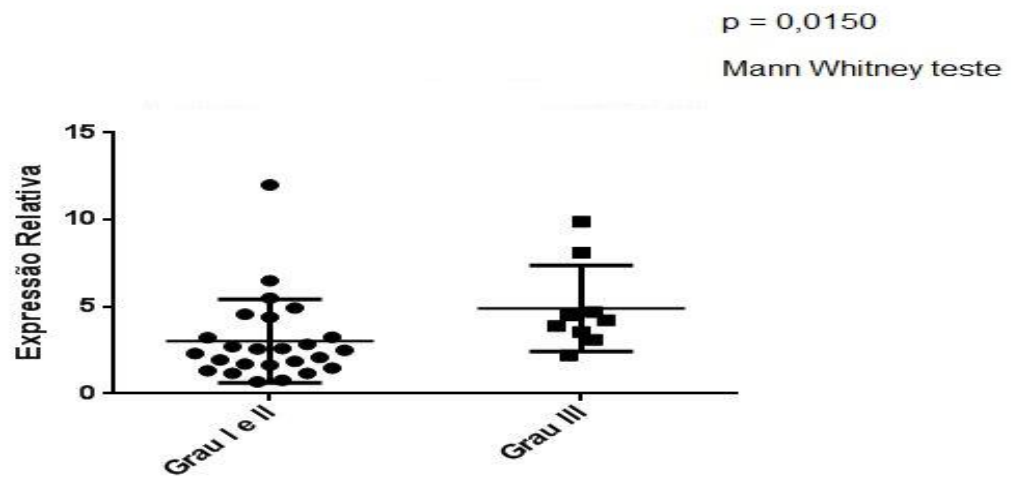


FIGURA 7 - GRÁFICO DE DISPERSÃO REFERENTE À EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *CHK1* EM TUMORES COM GRAU I/II E GRAU III.

5. DISCUSSÃO

Alterações genéticas que afetam as vias de controle do ciclo celular e reparo de DNA estão estritamente associadas com o surgimento de células neoplásicas. Muitos genes podem estar envolvidos nessas vias, vários deles bem estabelecidos e outros ainda não identificados. Estudos envolvendo cânceres de mama hereditários têm identificado genes de riscos variados, sendo *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *LKB1/STK11* e *CDH1* considerados de alto risco, enquanto que *CHK2*, *TGFβ1*, *CASP8* e *ATM* são de risco baixo ou moderado (PALACIOS *et al.*, 2008).

O câncer de mama é considerado um grupo de doenças de origem multifatorial e complexa, além de muito heterogêneo. É um campo de muitas pesquisas, que buscam compreender como os diversos processos envolvidos na carcinogênese ocorrem e como podem ser alvos de intervenção para melhorar a sobrevida dos pacientes. Muitos destes estudos são através da análise da expressão gênica (TURAGA; ACS; LARONGA, 2010).

A expressão gênica pode ser definida como a atividade do gene, sendo esta determinada pelo número de vezes que este é transcrito em mRNA e então traduzido em proteína. Análises através de qRT-PCR e microarranjo de DNA podem ser utilizadas para estudar o perfil da expressão gênica no nível de RNA, enquanto que a proteômica o faz no nível proteico (TURAGA; ACS; LARONGA, 2010).

Avaliar o nível de expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização do ciclo celular, assim como genes de reparo é uma ferramenta importante na elucidação de mecanismos envolvidos na formação de células neoplásicas (COWIN *et al.*, 2010).

O gene *CHK1* é um sinalizador do ciclo celular em resposta a diversos tipos de estímulos, entre eles luz ultravioleta e radiação ionizante. Alterando os níveis de CDC25A, *CHK1* age atrasando o ciclo celular nas fases S e G2 alterando a atividade de quinase do complexo ciclina/cdk E, A e B.

Nesse trabalho foram analisados 34 carcinomas mamários com o objetivo de analisar a expressão do gene *CHK1* relativamente a amostras não tumorais coletadas da mama contralateral. A expressão do gene em questão

foi de aproximadamente três vezes maior no tecido tumoral em relação ao tecido não tumoral de mama (TABELA 3 e FIGURA 5). Os dados gerados foram ainda analisados em relação a presença ou ausência de metástase, sendo que nesse caso, a expressão do *CHK1* foi de aproximadamente duas vezes maior em tumores que apresentavam metástase em relação aos que não apresentavam (TABELA 4 e FIGURA 6). Outra análise realizada baseou-se nos graus dos tumores, sendo estes divididos em grau I e II em relação aos de grau III. Foi observado que tumores de grau III apresentam a expressão do gene aproximadamente duas vezes maior em relação aos tumores de grau I e II (TABELA 5 e FIGURA 7).

Em todos os casos, as diferenças de expressão foram estatisticamente significativas, corroborando estudos anteriores como de Cho *et al.* (2005), que observaram que a expressão de *CHK1* é frequentemente maior em tecidos tumorais quando comparado com tecidos não tumorais adjacentes. Para os autores, a retenção da função do *CHK1* é vital para a sobrevivência do tumor, promovendo a sobrevivência das células em um ambiente altamente desregulado em suas funções de checagem do ciclo celular. A inibição do *CHK1* aumenta muito a propensão da célula sofrer apoptose após o estresse gerado pela replicação.

VERLINDEN *et al.*, (2007), avaliaram a expressão protéica de *CHK1*, *Claspin*, *E2F1* e *Ki-67* através de técnicas de imuno-histoquímica, sendo observada uma expressão aumentada do *CHK1* em tumores com graus elevados, assim como em tumores triplo negativos ER⁻, PR⁻ e HER2⁻.

Hong *et al.* (2012), descreveram que o gene *CHK1* apresenta uma expressão elevada em carcinomas hepatocelular (CHC) em relação ao tecido pareado não tumoral. Foi observado ainda que expressão elevada de *CHK1* está associada com pior sobrevida global e sobrevida livre de recidiva. Tais dados indicam que *CHK1* possa ter funções oncogênicas em carcinomas hepatocelular, sendo a expressão elevada um importante indicador de prognóstico em pacientes com CHC.

6. CONCLUSÃO

- Os valores de expressão do gene *CHK1* foram, em média, maiores no tecido tumoral do que no não tumoral, sendo a diferença estatisticamente significativa. Estes dados sugerem que o gene *CHK1* pode ter uma função relevante na progressão de carcinomas mamários.
- Esta informação está de acordo com os achados de que a expressão deste gene é maior nos tumores que apresentam metástase e nos de grau histológico III quando comparados com os de graus I e II, analisados em conjunto.
- Os dados apresentados estão de acordo com o observado na literatura, que também indicam que o gene *CHK1* é mais expresso em tecidos tumorais, estando positivamente relacionado à presença de metástase e ao grau histológico III.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADBURY, A.R. & OLOPADE, O.I. Genetic Susceptibility to breast cancer. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 8, n. 3, p. 255-267, 2007.

CARRASSA, L.; DAMIA, G. Unleashing Chk1 in cancer therapy. **Cell Cycle**, v. 10, n.13, p. 2121 – 2128, 2011.

CHO, S. H.; TOOULI, C. D.; FUJII, G. H.; CRAIN, C.; PARRY, D.; Chk1 is Essential for Tumor Cell Viability following Activation of the Replication Checkpoint. **Cell Cycle**, v. 4, n. 1, p. 131 – 139, 2005.

CHUN, J.; POCOCK, B.; JOSEPH, K.A.; EL-TAMER, M.; KLEIN, L.; SCHNABEL, F. Breast Cancer Risk Factors in Younger and Older Women. **Ann Surg Oncol**, v. 16, p. 96-99, 2009.

COUGHLIN, S. S.; EKWUEME, D. U. Breast cancer as global health concern. **Cancer Epidemiol.**, v. 33, p. 315-318, 2009.

COWIN, P. A.; ANGLÉSIO, M.; ETEMADMOGHADAM, D.; BOWTELL, D. D. Profiling the cancer genome. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 11, p. 133-159, 2010.

DALHUS, B.; LAERDAHL, J.K.; BACKE, P.H.; BJORA, M. DNA base repair recognition and initiation of catalysis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 33, p. 1044–1078, 2009.

DAMIA, G.; D'INCALCI. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. **European Journal of Cancer**, v. 43, p. 1791-1801, 2007.

EHEMAN, C.R.; SHAW, K.M.; RYERSON, A.B.; MILLER, J.W.; AJANI, U.A.; WHITE, M.C. The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and

Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 6, p. 1763-1769, 2009.

FU, J.; BIAN, L.; ZHAO, L.; DONG, Z.; GAO, X.; LUAN, H.; SUN, Y.; SONG, H. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. **Acta Biochim Biophys**, v. 42, p. 568-574, 2010.

GUERTIN, A. D.; MARTIN, M. M.; ROBERTS, B.; HURD, M.; QU, X.; MISELIS, N. R.; LIU, Y.; LI, J.; FELDMAN, I.; BENITA, Y.; BLOECHER, A.; TONIATTI, C.; SHUMWAY, S. D. Unique Functions of CHK1 and WEE1 underlie synergistic anti-tumor activity upon pharmacologic inhibition. **Cancer Cell International**, v. 12, n. 45, 2012.

GUIMARÃES, J.R. Manual de oncologia. 3ª ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica, 2008

GUO, ZIJIAN.; KUMAGAI, A.; WANG, S. X.; DUNPHY, W. G. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. **Genes Dev**. v. 14, p. 2745 – 2756, 2000.

HANAWALT, P. C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. **Oncogene**, 2158: 8949-8956, 2002.

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

HONG, J.; HU, K.; YUAN, Y.; SANG, Y.; BU, Q.; CHEN, G.; YANG, L.; LI, B.; HUANG, P.; CHEN, D.; LIANG, Y.; ZHANG, R.; PAN, J.; ZENG, Y.; KANG, T. CHEK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 2165 – 2175, 2012.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2012: Incidências de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2012. Acessado em março de 2012

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Perfil da Incidência. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2012. Acessado em março de 2012.

KIM, S.; LIM, D.; CANMAN, C. E.; KASTAN, M. B. Substrate Specificities and Identification of Putative Substrate of ATM Kinase Family Members. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, No. 53, p. 37538 – 37543, 1999.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Research**, v. 45, p. 1437-1443, 1985.

KOPNIN, B.P. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. **Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 2-27, 2000.

LIU, Q.; GUNTUKU, S.; CUI, X.; MATSUOKA, S.; CORTEZ, D.; TAMAI, K.; LUO, G.; CARATTINI-RIVERA, S.; DeMAYO, F.; BRADLEY, A.; DONEHOWER, L. A.; ELLEDGE, S. J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G₂/M DNA damage checkpoint. **Genes Dev**, v. 14, p. 1448 – 1459, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MEUTH, M. Chk1 suppressed cell death. **Cell division**, v. 5, n.11, 2010.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 9-41, 2003.

NUSSBAUM, R. L. *Genética Médica*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 63, p. 125-149, 2007.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potencial Diagnostic and Therapeutic Applications. **The Oncologist**, v. 9, p. 361-377, 2004.

PALACIOS, J.; ROBLES-FRIAS, M. J.; CASTILLA, M. A.; LOPEZ-GARCIA, M. A.; BENITEZ, J. The Molecular Pathology of Hereditary Breast Cancer. **Pathbiology**, v. 75, p. 85-94, 2008.

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

R&D SYSTEMS®. **Minireviews**. DNA damage response. Disponível em: < http://www.rndsystems.com/MiniReview_MR03_DNADamageResponse.aspx > Acessado em março de 2012.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical application. **CMAJ.**, v. 174, n. 3, p. 341-8, 2006.

ROSS, J.S.; SLODKOWSKA, E.A.; SYMMANS, W.F.; PUSZTAI, L.; RAVDIN, P.M.; HORTOBAGYI, G.N. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. **The Oncologist**, v. 14, p. 320-368, 2009.

SORBY, L.A. ; ANDERSEN, S.N. ; BUKHOLM, I.R. ; JACOBSEN, M.B. Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer. **J Exp Clin Cancer Res.**, v. 29, p. 144, 2010.

SORENSEN, C. T.; SYLJUASEN, R. G. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 477-486, 2011.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 10869 –10874, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 8418 – 8423, 2003.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, p. S1–S5, 2010.

TOMASKOVIC-CROOK, E.; THOMPSON, E. W.; THIERY, J. P. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 6, 2009.

TLSTY, T.D.; CRAWFORD, Y.G.; HOLST, C.R.; FORDYCE, C.A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M.L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, 2004.

TURAGA; K.; ACS, G.; LARONGA, C. Gene expression profiling in breast cancer. **Cancer Control**, v. 3, p. 177-182, 2010.

VARGO-GORGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modeling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n.9, p. 659-72, 2007.

VERLINDEN, L.; BEMPT, I. V.; EELEN, G.; *et al.* The E2F-Regulated Gene *CHK1* Is Highly Expressed in Triple-Negative Estrogen Receptor - /Progesterone Receptor -/ HER-2- Breast Carcinomas. **Cancer Res**, v. 67, p. 6574 – 6581, 2007.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 245, p. 1138-1145, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em Março de 2012.

YANG, JUN.; XU, Z.; HUANG, Y.; HAMRICK, H. E.; DUERKSEN-HUGHES, P. J.; YU, Y. ATM and ATR: Sensing DNA damage. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 2, p. 155 – 160, 2004.

ANEXO

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

ANEXO 2 – Tabela com dados referentes aos Ct's e eficiências das amostras.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

Nome do Estudo: “Caracterização da Expressão de Genes de Reparo como Estratégia Terapêutica em Carcinomas Mamários.”

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial. E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

ANEXO 2

Tabela com dados referentes aos Ct's e eficiências das amostras.

Tumoral	Gene	Ct	Ct médio	Eficiência	Eficiência Média	Gene	Ct	Ct Médio	Eficiência	Eficiência Média	Gene	Ct	Ct Médio	Eficiência	Eficiência Média
Amostras															
CP 647	ACTB	18.957		1.310		B2M	21.177		0.909		CHK1	29.786		1.266	
	ACTB	19.677	19.203	1.025	1.010	B2M		21,313		0,935	CHK1	29.568	29.726	0.679	0.979
	ACTB	18.976		0.696		B2M	21.449		0.898		CHK1	29.825		0.994	
CP 648	ACTB	16.202	16.316	0.864	0.957	B2M	19.217	19.151	1.148	1.033	CHK1	28.049		1.138	
	ACTB	16.431		1.051		B2M	19.086		0.918		CHK1	28.123	28.095	1.115	1.065
	ACTB					B2M					CHK1	28.113		0.941	
CP 649	ACTB	18.219		0.650		B2M					CHK1				
	ACTB	18.502	18.448	1.067	0.951	B2M	20.191	20,213	0.874	0,864	CHK1	28.975	28,909	0.778	0,857
	ACTB	18.622		1.135		B2M	20.236		0.855		CHK1	28.843		0.937	
CP 651	ACTB	19.425		1.113		B2M	21.573	21.498	1.182	1.078	CHK1	30.061		0.793	
	ACTB	19.551	19.400	1.068	0.976	B2M	21.423		0.975		CHK1	29.578	29.84	0.965	0.972
	ACTB	19.223		0.747		B2M					CHK1	29.879		1.157	
CP 653	ACTB	18.420		1.372		B2M	19.209		0.943		CHK1	28.913		0.955	
	ACTB	18.371	18.367	0.736	0.970	B2M	19.226	19.198	1.059	1.061	CHK1	29.267	29.09	1.154	1.054
	ACTB	18.309		0.800		B2M	19.160		1.180		CHK1				
CP 656	ACTB	15.494		0.929		B2M	17.914		0.732		CHK1	25.317		0.903	
	ACTB	15.915	18.785	0.972	0.945	B2M	18.100	17.949	1.266	0.993	CHK1	24.901	25.109	0.804	0.853
	ACTB	15.948		0.936		B2M	17.835		0.983		CHK1				
CP 657	ACTB	16.599		0.788		B2M	16.998		0.982		CHK1	27.367		0.935	
	ACTB	16.742	16.772	0.915	0,92	B2M	18.542	17.962	0.973	1.004	CHK1	27.283	27.248	0.882	0,975
	ACTB	16.975		1.057		B2M	18.347		1.058		CHK1	27.096		1.108	
CP 659	ACTB	15.945		1.240		B2M	18.925		0.883		CHK1	26.09		1.213	

	ACTB	16.351	16,306	0.781	0,934	B2M	18.479	18,702	0.917	0,900	CHK1		26.186		1.060
	ACTB	16.622		0.783		B2M					CHK1	26.283		0.908	
CP 661	ACTB	16.773		0.572		B2M	19.313		0.713		CHK1	26.869		0.949	
	ACTB	16.728	16,870	0.973	0.906	B2M	19.261	19,241	0.973	0.913	CHK1	27.052	26,924	0.782	0.990
	ACTB	17.110		1.173		B2M	19.151		1.055		CHK1	26.851		1.240	
CP 662	ACTB	16.616		0.930		B2M	18.035		0.821		CHK1	25.081		0.852	
	ACTB	16.715	16,665	0.797	0,863	B2M	18.048	18,042	1.069	0.945	CHK1	25.014	25,047	1.130	0.991
	ACTB					B2M					CHK1				
CP 663	ACTB	16.148		0.747		B2M	17.446		0.730		CHK1	25.618		1.027	
	ACTB	16.358	16,253	1.310	1,028	B2M	17.533	17,489	1.097	0,913	CHK1		25,687		1,087
	ACTB					B2M					CHK1	25.756		1.147	
CP 665	ACTB	16.445	16,472	0.957	0,881	B2M					CHK1	27.446		1.028	
	ACTB	16.499		0.804		B2M	16.954	16,95	0.977	0,990	CHK1	27.785	27,657	0.852	1,049
	ACTB					B2M	16.947		1.004		CHK1	27.740		1.266	
CP 669	ACTB	16.864		0.799		B2M	17.626		0.903		CHK1	27.05		0.960	
	ACTB		16,879		0,879	B2M	17.496	17,561	0.864	0,883	CHK1	27.122	27,191	0.944	0,929
	ACTB	16.895		0.960		B2M					CHK1	27.402		0.884	
CP 677	ACTB	15.265		0.899		B2M	15.249		0.933		CHK1	24.509		0.681	
	ACTB		15,270		0,855	B2M	15.619	15,527	0.967	0,925	CHK1	24.283	24,396	1.134	0,907
	ACTB	15.276		0.811		B2M	15.713		0.874		CHK1				
CP 678	ACTB	16.502		1.214		B2M	16.748		0.970		CHK1	25.569		0.856	
	ACTB	16.326	20,692	0.839	0,982	B2M	16.795	16,820	0.815	0,854	CHK1	25.579	25,528	0.933	0,855
	ACTB	16.491		0.892		B2M	16.916		0.778		CHK1	25.436		0.776	
CP 679	ACTB	16.990		1.031		B2M	19.444		0.801		CHK1				
	ACTB		16,989		0,95	B2M		19,268		0,85	CHK1	27.441	24,459	0.943	1,012
	ACTB	16.989		0.870		B2M	19.093		0.899		CHK1	27.477		1.082	
CP 684	ACTB	16.655		1.539		B2M	18.481		0.819		CHK1	26.953		1.178	
	ACTB	16.954	16,862	0.791	1,019	B2M	18.299	18,390	1.011	0,915	CHK1	26.789	26,69	1.001	0,932

	ACTB	16.977		0.727		B2M					CHK1	26.326		0.618	
CP 685	ACTB	16.068		1.366		B2M	18.147		0.908		CHK1	26.843		0.839	
	ACTB	16.522	16.320	1.242	1.067	B2M	18.056	18.102	0.808	0.858	CHK1	26.832	26.857	1.129	1.093
	ACTB	16.370		0.592		B2M					CHK1	26.896		1.311	
CP 687	ACTB	21.180		0.852		B2M	22.623		0.758		CHK1	32.177		1.222	
	ACTB		21,129		0,886	B2M	23.013	22,818	1.104	0,931	CHK1	31.973	32.075	0.799	1.010
	ACTB	21.079		0.920		B2M					CHK1				
CP 688	ACTB					B2M	21.360		0.943		CHK1				
	ACTB	20.732	20.581	0.897	0.882	B2M		21.097		1.001	CHK1	32.091	32.316	1.034	1.031
	ACTB	20.431		0.868		B2M	20.834		1.059		CHK1	32.542		1.029	
CP 690	ACTB	20.905		0.977		B2M	22.326		0.835		CHK1	30.038		0.920	
	ACTB	20.685	20,795	0.804	0,89	B2M	21.978	22.185	0.917	0.886	CHK1	29.966	30.002	0.854	0.887
	ACTB					B2M	22.252		0.906		CHK1				
CP 694	ACTB	15.861		0.688		B2M	17.680		0.825		CHK1	26.341		0.754	
	ACTB	15.939	15.900	1.409	1.049	B2M	18.103	17,983	0.970	0,907	CHK1	26.402	26,337	1.088	1,016
	ACTB					B2M	18.166		0.926		CHK1	26.270		1.206	
CP 697	ACTB					B2M					CHK1				
	ACTB	15.469	15.571	1.133	0.979	B2M	17.896	18.098	0.800	0.913	CHK1	27.226	27.339	1.068	0.919
	ACTB	15.674		0.826		B2M	18.301		1.026		CHK1	27.453		0.770	
CP 698	ACTB	16.699		1.265		B2M					CHK1	27.203		0.960	
	ACTB	16.771	16,693	0.918	1,028	B2M	18.763	18,625	1.071	1,031	CHK1	27.495	27,282	0.940	0,929
	ACTB	16.609		0.902		B2M	18.488		0.991		CHK1	27.149		0.888	
CP 699	ACTB	17.826		0.738		B2M	20.466		1.039		CHK1				
	ACTB	17.963	17.963		0.893	B2M		20.338		0.875	CHK1	28.893	29.012	0.971	0.901
	ACTB	18.101		1.048		B2M	20.210		0.712		CHK1	29.142		0.831	
CP 705	ACTB	17.481		1.370		B2M	17.616		1.108		CHK1	28.756		0.937	
	ACTB	17.575	17,278	0.990	1,095	B2M	18.549	18.192	0.638	0.869	CHK1	28.885	28,762	0.884	0,923
	ACTB	16.78		0.927		B2M	18.411		0.861		CHK1	28.645		0.950	

CP 707	ACTB	16.391		0.595		B2M	18.306		0.835		CHK1	26.393		0.797	
	ACTB	16.584	16.488	1.126	0.860	B2M		18,335		0,842	CHK1	26.272	26.332	0.987	0.892
	ACTB					B2M	18.364		0.849		CHK1				
CP 708	ACTB	16.392		0.789		B2M	19.606		1.087		CHK1				
	ACTB		16.172		0.939	B2M	20.032	19.792	1.061	1.073	CHK1	26.092	26.172	1.177	1.127
	ACTB	15.952		1.089		B2M	19.738		1.070		CHK1	26.253		1.078	
CP 709	ACTB	16.345		0.956		B2M					CHK1	25.523		1.050	
	ACTB		16,56		0,925	B2M	18.833	19,018	1.088	0,925	CHK1	25.228	25,343	0.797	0,901
	ACTB	16.775		0.894		B2M	19.204		0.762		CHK1	25.279		0.857	
CP 717	ACTB	15.394		0.907		B2M	17.466		0.734		CHK1	26.407		1.118	
	ACTB	15.751	15.638	0.859	0,898	B2M	17.295	17.26	0.805	0,951	CHK1	26.430	26.49	1.104	1,075
	ACTB	15.770		0.928		B2M	17.019		1.314		CHK1	26.633		1.003	
CP 724	ACTB	16.074		0.933		B2M					CHK1	25.809		0.805	
	ACTB	16.131	16.212	0.763	0.909	B2M	16.675	16,784	0.926	0,974	CHK1	25.792	25,775	1.100	0,905
	ACTB	16.432		1.030		B2M	16.894		1.022		CHK1	25.724		0.810	
CP 726	ACTB	16.547		0.860		B2M	19.368		1.035		CHK1	28.141		0.908	
	ACTB	16.647	16,601	1.057	1,016	B2M	19.590	19,408	0.873	1,012	CHK1	27.925	28,056	0.906	0,925
	ACTB	16.611		1.132		B2M	19.266		1.129		CHK1	28.102		0.962	
CP 727	ACTB					B2M					CHK1	27.456		0.954	
	ACTB	15.238	15,253	0.907	0,919	B2M	16.049	15,976	0.909	0,886	CHK1	27.203	27,315	0.813	0,973
	ACTB	15.268		0.932		B2M	15.904		0.864		CHK1	27.288		1.153	
CP 728	ACTB	14.696		0.781		B2M	15.923		1.205		CHK1				
	ACTB		14,506		0,85	B2M	15.975	16.955	0.997	1.021	CHK1	25.655	25,755	0.757	0,85
	ACTB	14.316		0.919		B2M	15.669		0.861		CHK1	25.855		0.939	
Não tumoral	Gene	Ct	Ct médio	Eficiência	Eficiência Média	Gene	Ct	Ct Médio	Eficiência	Eficiência Média	Gene	Ct	Ct Mean	Eficiência	Eficiência Média
CP 703 NT	ACTB					B2M					CHK1	29.248		1.165	

	ACTB	16.705	16,684	1.275	1,027	B2M	18.007	17,990	0.866	0,907	CHK1	29.315	29,065	0.901	0,981
	ACTB	16.663		0.927		B2M	17.974		0.949		CHK1	28.634		0.878	
CP 704 NT	ACTB					B2M	18.706		0.859		CHK1	30.309		1.153	
	ACTB	17.344	17,223	0.885	0,879	B2M	18.647	18,676	0.871	0,865	CHK1	30.055	30,198	0.975	1,009
	ACTB	17.103		0.873		B2M					CHK1	30.232		0.899	
CP 710 NT	ACTB	17.979		1.185		B2M	19.857		0.935		CHK1	29.407		0.914	
	ACTB	17.811	17,895	0.866	1,025	B2M	20.048	20,019	0.764	0,904	CHK1	29.888	29,488	1.161	0,947
	ACTB					B2M	20.151		1.013		CHK1	29.170		0.766	
CP 717 NT	ACTB					B2M					CHK1				
	ACTB	16.791	16,732	0.906	0,999	B2M	18.360	18,338	0.896	0,894	CHK1	29.040	29,095	0.848	0,982
	ACTB	16.674		1.093		B2M	18.316		0.893		CHK1	29.150		1.116	
CP 719 NT	ACTB	16.691		0.955		B2M	19.329		0.854		CHK1	29.150		0.878	
	ACTB	16.718	16,704	1.089	1,022	B2M	19.455	19,430	1.234	1,042	CHK1	28.987	29,072	0.979	0,942
	ACTB					B2M	19.506		1.038		CHK1	29.081		0.970	
CP 720 NT	ACTB	16.713		1.014		B2M					CHK1	28.157		1.105	
	ACTB		16,617		1,029	B2M	17.504	17,683	1.183	1,054	CHK1	27.970	27,897	1.333	1,003
	ACTB	16.522		1.045		B2M	17.862		0.925		CHK1	27.566		0.573	
CP 724 NT	ACTB	16.230		0.860		B2M	16.850		0.846		CHK1	29.139		0.857	
	ACTB	16.328	16,279	1.120	0,990	B2M	17.047	16,948	0.943	0,894	CHK1	28.868	29,003	0.868	0,862
	ACTB					B2M					CHK1				
CP 730 NT	ACTB	15.825		1.137		B2M	16.548		1.052		CHK1	28.044		1.218	
	ACTB	15.746	15,703	0.883	0,978	B2M	16.574	16,589	0.807	0,902	CHK1	28.046	27,961	1.127	1,046
	ACTB	15.538		0.916		B2M	16.646		0.848		CHK1	27.794		0.795	