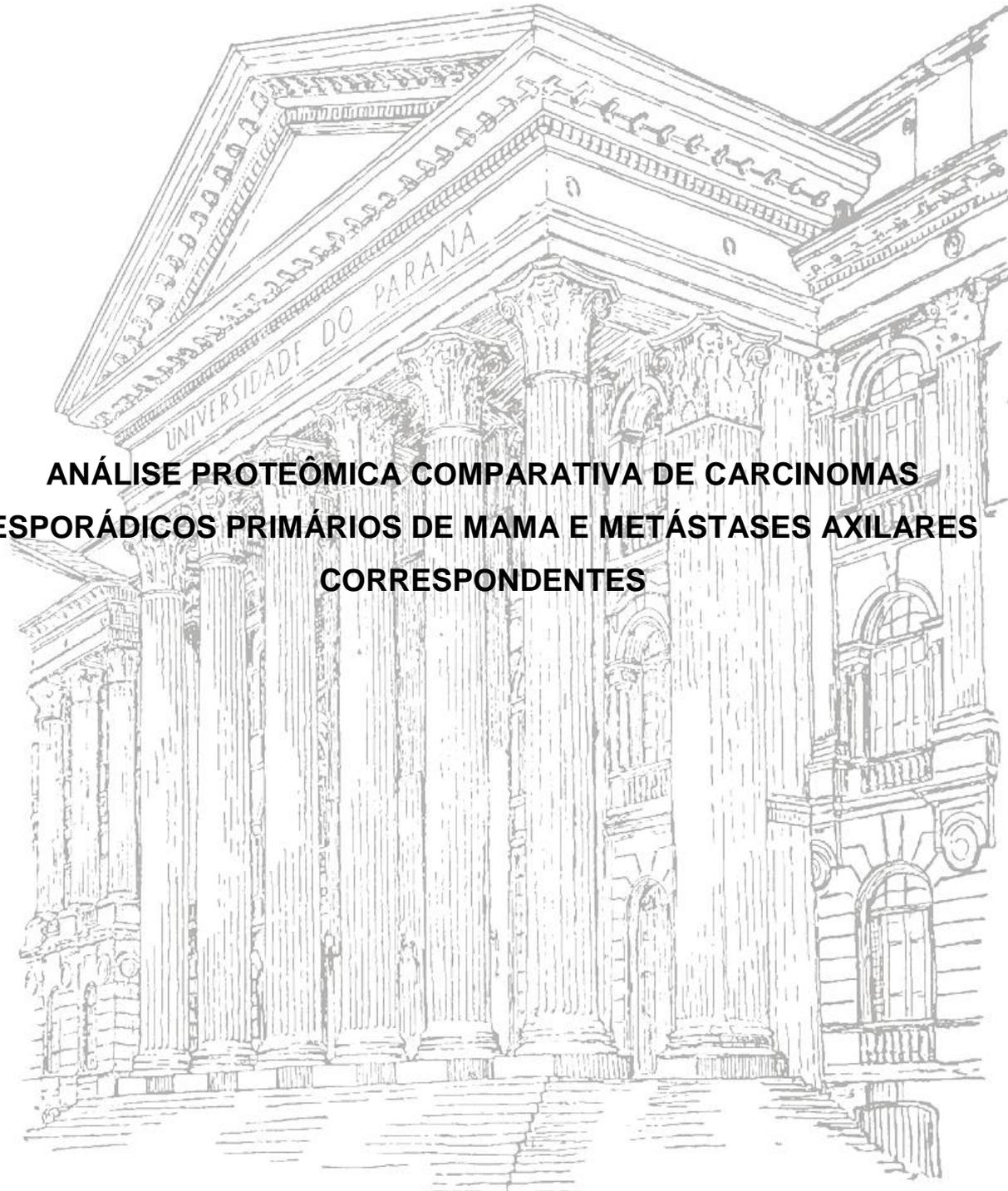


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA HELENA ZACCARON MILIOLI



**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS
ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E METÁSTASES AXILARES
CORRESPONDENTES**

CURITIBA

2011

HELOISA HELENA ZACCARON MILIOLI

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS
ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E METÁSTASES AXILARES
CORRESPONDENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

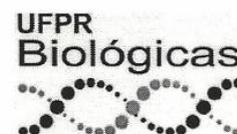
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

CURITIBA

2011



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **HELOISA HELENA ZACCARON MILIOLI** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de março de 2011

Professor Doutor Cícero de Andrade Urban
Universidade Positivo – Membro Titular

Professora Doutora Ana Claudia Bonatto
Depto. de Genética, UFPR – Membro Titular

Professor Doutor Ricardo Lehtonen R. de Souza
Depto. de Genética, UFPR – Membro Titular

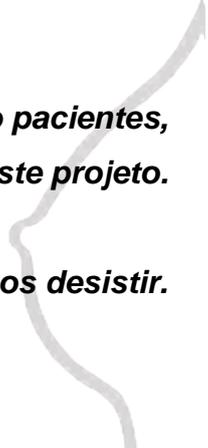
Professor Doutor Iglénir João Cavalli
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Visto

Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

***Dedico este trabalho a todas as mulheres que, como pacientes,
tornaram possível este projeto.***

Por me fazerem acreditar que não podemos desistir.



AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Iglénir João Cavalli*, pela oportunidade e orientação conferida, por acreditar no meu trabalho, pelas palavras de incentivo, pelos sábios ensinamentos e, principalmente, pelo exemplo como pessoa e pesquisador.

À *Profª. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro*, pelo carinho, paciência, disponibilidade e atenção.

À *Profª. Dra. Roseli Wassem* por participar da banca de acompanhamento. Ao *Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban* e à *Profª. Dra. Ana Claudia Bonatto* por fazerem parte da banca de defesa. Ao *Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza* por constituir ambas as bancas deste trabalho. Obrigada pelo tempo e dedicação ao analisar e avaliar este trabalho, por todas as sugestões e correções. Minha admiração e reconhecimento.

Ao *Hospital das Clínicas e Hospital Nossa Senhora das Graças*, seus médicos, pacientes e funcionários, por tornarem este trabalho possível.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Genética* da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo suporte físico e intelectual, que contribuíram de modo direto para a formação do meu caráter e postura profissional.

Aos Departamentos de *Patologia Básica e Bioquímica*, pelo apoio técnico e infra-estrutura. Ao aluno do programa de pós-graduação em Bioquímica, *Fábio Cordeiro*, pelo apoio e incentivo nos desdobramentos das técnicas proteômicas.

Ao *Centro de Biotecnologia* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial ao *Prof. Dr. Charley Christian Staats* e à técnica *Jozi Fernanda R. Estanislau*, por me receberem da melhor forma possível, pela assistência imediata e incondicional.

Ao laboratório comum do departamento de Genética (*SEAD*) e sua funcionária *Silvana Cribari Prado*. Obrigada pela companhia, atenção e carinho.

A todos os *amigos e companheiros* do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, por me acolherem, pelo carinho, compreensão e grande amizade. Por dividirem felicidades e angústias ao longo desses dois anos intensos. Em especial, às alunas de iniciação científica *Ágatha Gomes da Silva* e *Thalita Helen Bombardelli Gomig*, pelo interesse e dedicação.

Aos mestres em Genética *Rodrigo Kaviski* e *Gustavo Góes da Costa*, pelo apoio e companheirismo.

À minha parceira dentro e fora da universidade, *Nayara Cristina dos Santos Oliveira*. Por dividir momentos de concentração, diversão, alegria, decepção, raiva, tristeza; um misto de sentimentos que contribuíram para nosso desenvolvimento pessoal, no individual e no coletivo.

Àqueles que deram suporte para continuar trabalhando sempre que possível. Obrigada *Juliana Marta Muehlmann Fischer*.

Halina Linzmeier Heyse e *Adriane Esquivel*, por tornarem minha vida mais especial em Curitiba. Por fazerem da nossa amizade algo que será levado comigo para o resto da vida.

A *todos* que contribuíram para realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos!

Em especial...

À minha família, meus maiores incentivadores, pelo apoio incondicional e pelo carinho de sempre. Por acreditarem na minha capacidade, enquanto eu duvidava.
Aos meus pais, *Ademir* e *Eliane*, por abdicarem de seus sonhos em favor dos meus.

Por fazerem dos meus objetivos, suas metas.
Ao meu único e eterno irmão, *Tito*. Por me entender com um olhar, com um gesto, e com uma simples palavra me confortar. Por tudo que representas pra mim.

Yuri, por me fazer esquecer os momentos mais tensos com seu encanto.
À *Helena* e *Lourdes*, pelo amor que me dedicam sempre e, principalmente, pela
confiança.

Aos meus cunhados amados, por me respeitarem, ou simplesmente por existirem.

Ao *Jorge André*, pela paciência, cumplicidade e companheirismo em todos esses anos. Por minimizar a distância entre nós. Por manter meus pés no chão e orientar meus passos, sempre próximo aos seus.

Obrigada por me ensinarem que a forma com que trilhamos os caminhos pode ser
mais gratificante do que chegar ao fim da linha...

***"Todos estamos matriculados na escola da vida,
onde o maior mestre é o tempo."***

Cora Coralina

RESUMO

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E LINFONODOS AXILARES CORRESPONDENTES

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais freqüente em mulheres no mundo, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade. A interação gene-ambiente contribui de modo distinto para a predisposição ao carcinoma mamário e para o desenvolvimento de um perfil tumoral característico, complexo e heterogêneo. A evolução no aspecto clínico do câncer de mama está associada a uma cascata de eventos que envolvem alterações em genes e/ou proteínas importantes no crescimento, proliferação, apoptose, angiogênese e metástase. A extensão da disseminação de células tumorais em vias linfáticas pode ser avaliada através do *status* de linfonodos axilares, atualmente utilizado como importante indicador clínico para prognóstico no câncer de mama. Os mecanismos moleculares subjacentes à metástase linfonodal, o grau de divergência clonal e a variedade genômica que caracterizam tumores primários e linfonodos axilares metastáticos, contudo, permanecem mal compreendidos. O objetivo principal deste trabalho consiste numa análise proteômica comparativa entre amostras pareadas de tumores primários de mama e linfonodos axilares, utilizando as metodologias proteômicas de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massa (MALDI-ToF). Sete amostras pareadas de tumores primários de mama e correspondente linfonodo metastático foram avaliadas de pacientes com 'Carcinoma Ductal Invasivo'. Os géis bidimensionais revelaram uma sutil diferença entre o perfil proteômico de tumores primários e linfonodos axilares metastático quando comparados em conjunto. Em análise subsequente, em amostras pareadas dos sete tumores primários e respectivos linfonodos axilares, diferenças quantitativas e qualitativas significativas foram observadas na comparação dos perfis individuais de cada paciente. As diferenças observadas nos dois tipos de análise são devidas provavelmente ao procedimento metodológico. Foram excisadas 163 bandas com valor de $p < 0,02$, totalizando 146 proteínas identificadas, sendo 72 distintas. Proteínas exclusivas ou com expressão aumentada foram observadas tanto em tumores primários como em linfonodos axilares. As proteínas foram classificadas de acordo com a função biológica dentro das seguintes categorias: (1) citoesqueleto e proteínas associadas, 31,30%; (2) enzimas metabólicas, 4,76%; (3) proteínas 'heat shock' chaperonas moleculares, 2,04%; (4) proteínas de membrana com múltiplas atividades, 1,36%; (5) proteínas de ligação, 2,72%; (6) biossíntese de proteínas, 2,04%; (7) biossíntese de nucleotídeos, 0,68%; (8) reguladores do crescimento e da proliferação celular, 9,52%; (9) degradação protéica, 5,45%; (10) detoxificação e proteínas redox, 2,72%; (11) proteínas com atividade extracelular, 12,24%; (12) outras funções, 0,68%; e (13) queratinas do citoesqueleto, 24,49%, um subgrupo particular. Em sua maioria, as funções biológicas das proteínas apresentam papel relevante na carcinogênese mamária, em processos de divisão celular, organização do citoesqueleto, diferenciação, proliferação e apoptose. As possíveis variações observadas também podem ser úteis como possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama, ou ainda contribuir para o entendimento das vias biológicas responsáveis pela transformação e progressão neoplásica. Outras metodologias com abordagens genômicas e proteômicas, naturalmente, devem ser utilizadas para a validação dos resultados.

Palavras-Chave: Proteoma; 2D-PAGE; Carcinoma mamário: Tumor primário e linfonodo axilar.

ABSTRACT

COMPARATIVE PROTEOME ANALYSIS OF PRIMARY BREAST CARCINOMA AND RESPECTIVE AXILARIES LYMPH NODES

Breast cancer is the second most common type of cancer among women worldwide, responsible for high morbidity and mortality. The gene-environment interaction and inter-individual variation contributes differently in the predisposition to breast cancer and for development of a characteristic tumor profile, complex and heterogeneous. Developments in clinical appearance of breast cancer is associated with a cascade of events that involve changes in genes / proteins responsible for cellular events such as growth, proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis. The extent of spread of tumor cells in lymphatic pathways can be assessed by the status of axillary lymph nodes, currently used as an important indicator for clinical prognosis in breast cancer. The molecular mechanisms underlying lymph node metastasis, degree of clonal divergence and variety that characterize genomic primary tumors and metastatic axillary lymph nodes, however, remain poorly understood. This study establishes a comparative proteomic analysis between paired primary breast tumors and axillary lymph node, using proteomic methodologies of bidimensional electrophoresis (2D-PAGE) and mass spectrometry (MALDI-ToF). Seven paired 'Invasive Ductal Carcinoma' and respective axillary lymph node were evaluated. The two-dimensional gels revealed subtle differences between the proteomic profile of primary tumors and metastatic axillary lymph nodes when compared all together. In subsequent analysis, significant qualitative and quantitative differences were observed comparing the profiles of individual patients. In total, 163 bands with $p < 0.02$ were excised, comprising 146 proteins identified, 72 distinct. The proteins were classified according to biological function in the following categories: (1) cytoskeleton and associated proteins, 31.30%; (2) metabolic enzymes, 4.76%; (3) molecular chaperones / 'heat shock', 2.04%; (4) membrane-associated proteins with multiple activities, 1.36%; (5) protein with binding function, 2.72%; (6) protein biosynthesis, 2.04%; (7) nucleotide biosynthesis, 0.68%; (8) cell growth and proliferation regulators, 9.52%; (9) protein degradation, 5.45%; (10) detoxification and redox protein, 2.72%; (11) proteins with extracellular activity, 12.24%; (12) other functions, 0.68%; and (13) cytoskeletal keratins, 24.49%, as a particular subgroup. Most of the biological functions of proteins may be involved in breast carcinogenesis, in processes of cell division, cytoskeletal organization, differentiation, proliferation and apoptosis. Possible changes observed may also be useful as potential markers for diagnosis and prognosis in breast cancer, or contribute to the understanding of the biological pathways responsible for neoplastic transformation and progression. Other methodologies in genomics and proteomics approaches should be used to validate the results.

Keywords: Proteome; 2D-PAGE; Breast cancer: primary tumor and axillary lymph node.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	FORMAÇÃO DE DÍMERO <i>ERBB2/ERBB3</i> E SINALIZAÇÃO <i>DOWNSTREAM</i>	10
FIGURA 02	DIVERSIFICAÇÃO CLONAL REPRESENTADA POR ALTAS TAXAS DE MUTAÇÃO.....	17
FIGURA 03	CAPACIDADES ADQUIRIDAS POR CÉLULAS CANCEROSAS.....	18
FIGURA 04	ESTRUTURA INTERNA DA MAMA.....	23
FIGURA 05	CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS – TNM.....	25
FIGURA 06	NÍVEIS DE LINFONODOS AXILARES: I, II E III.....	31
FIGURA 07	REDE LINFÁTICA DISTRIBUÍDA NA SUPERFÍCIE DO TÓRAX, PESCOÇO E ABDÔMEN.....	32
FIGURA 08	DIAGRAMA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSA COM DESSORÇÃO/ IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO.....	44
FIGURA 09	PARÂMETROS DE BUSCA (PMF – <i>PEPTIDE MASS FINGERPRINT</i>).....	57
FIGURA 10	GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 645L3.....	64
FIGURA 11	GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 645T3.....	65
FIGURA 12	GÉIS BIDIMENSIONAIS DA AMOSTRA CP 638L3 E CP 638T1.....	66
FIGURA 13	GÉIS BIDIMENSIONAIS DAS AMOSTRAS CP 645L3 E CP 645T3 COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO CONJUNTO DE LINFONODOS AXILARES E DE TUMORES PRIMÁRIOS.....	69
FIGURA 14	IMAGENS DE <i>SPOTS</i> DIFERENCIAIS OBSERVADOS ENTRE AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES.....	72
FIGURA 15	IMAGENS DE <i>SPOTS</i> DIFERENCIAIS OBSERVADOS ENTRE AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	72
FIGURA 16	IMAGENS DE REGIÕES DIFERENCIAIS OBSERVADAS ENTRE AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	73
FIGURA 17	CP 622: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	76
FIGURA 18	CP 627: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	81

FIGURA 19	CP 630: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	85
FIGURA 20	CP 633: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	89
FIGURA 21	CP 641: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	94
FIGURA 22	CP 644: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	101
FIGURA 23	CP 645: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO.....	108
FIGURA 24	ESPECTROS DE MASSAS GERADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE <i>GSTP1</i>	113
FIGURA 25	ESPECTROS DE MASSAS GERADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE <i>VIME</i> e <i>TRFE</i>	114
FIGURA 26	GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA REFERÊNCIA CP 645L E O PERFIL PROTEÔMICO DIFERENCIAL ESPRESSO NO CONJUNTO DE LINFONODOS AXILARES.....	118
FIGURA 27	GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA REFERÊNCIA CP 645T E O PERFIL PROTEÔMICO DIFERENCIAL ESPRESSO NO CONJUNTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	122
FIGURA 28	PROTEÍNA ALFA 1 ANTITRIPSINA IDENTIFICADA EM DIFERENTES BANDAS NO CONJUNTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	135
FIGURA 29	PROTEÍNA VIMENTINA IDENTIFICADA EM DIFERENTES BANDAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	145
FIGURA 30	ISOFORMAS DE POLI (ADP-RIBOSE) GLICOHIDROLASE (PARG).....	148

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	ESTIMATIVAS PARA O ANO 2010 DE NÚMERO DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM HOMENS E MULHERES, SEGUNDO LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA.....	05
TABELA 02	SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O CONJUNTO DE AMOSTRAS DE LINFONODO AXILAR E TUMOR PRIMÁRIO.....	67
TABELA 03	IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O CONJUNTO DE AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES E DE TUMORES PRIMÁRIOS.....	70
TABELA 04	CP 622: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	74
TABELA 05	CP 622: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	77
TABELA 06	CP 627: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	79
TABELA 07	CP 627: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	82
TABELA 08	CP 630: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	83
TABELA 09	CP 630: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	86
TABELA 10	CP 633: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	88
TABELA 11	CP 633: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	90
TABELA 12	CP 641: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	92

TABELA 13	CP 641: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILARE E O TUMOR PRIMÁRIO.....	95
TABELA 14	CP 644: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	99
TABELA 15	CP 644: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	103
TABELA 16	CP 645: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	105
TABELA 17	CP 645: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO.....	109
TABELA 18	IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS OBSERVADAS SOMENTE NOS LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS.....	115
TABELA 19	IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA NOS LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS.....	116
TABELA 20	IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS OBSERVADAS SOMENTE EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	119
TABELA 21	IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	119
TABELA 22	CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ACORDO COM A SUA FUNÇÃO.....	124

QUADROS

QUADRO 01	SISTEMA TNM: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS TUMORES DE MAMA PROPOSTO POR UICC/AJCC.....	25
QUADRO 02	ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES POSSÍVEIS DO SISTEMA TNM.....	27
QUADRO 03	PROGRAMA PARA O <i>ETTAN IPGPHOR II</i> , EM TIRAS DE 13cm (pH 4 - 7)	51
QUADRO 04	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL.....	58
QUADRO 05	AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES UTILIDADAS NA EXTRAÇÃO E O RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA.....	60
QUADRO 06	AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS UTILIDADAS NA EXTRAÇÃO E O RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA.....	60
QUADRO 07	NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS EM GÉIS BIDIMENSIONAIS DE AMOSTRAS DE LINFONODO AXILAR E TUMOR PRIMÁRIO.....	62

GRÁFICO

GRÁFICO 01	CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS..	123
------------	---	-----

SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	<i>American Cancer Society</i> – Sociedade Americana do Câncer
AJCC	<i>America Joint Committee on Cancer</i> – Comissão Americana Mista do Câncer
AT	Ataxia-telangiectasia (síndrome)
BSA	Albumina de soro bovino
CD	Carcinoma Ductal
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
cDNA	DNA complementar
CL	Carcinoma Lobular
CLIS	Carcinoma Lobular <i>in situ</i>
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CI	Carcinoma Invasivo
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
EA	Esvaziamento axilar
<i>EGFR</i>	Receptor de fator de crescimento epidermal
eIF	<i>Eukaryotic translation initiation factor</i> – Fator de iniciação da tradução em Eucariotos
2D PAGE	Eletroforese bidimensional
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
<i>FGF</i>	Fator de crescimento fibroblástico
GF	Fator de crescimento
HAt	Histona acetiltransferase
HDAc	Histona desacetilase
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico
HDGC	Câncer Gástrico Difuso Hereditário (síndrome)
HNSG	Hospital Nossa Senhora das Graças
HSP	<i>Heat shock protein</i> – Proteínas de Choque Térmico
HUPO	<i>Human Proteome Organization</i> – Organização do Proteoma Humano
ICAT	<i>Isotope Coded Affinity Tags</i> – Codificação Isotópica combinada a etiqueta de afinidade
IEF	Isoeletrofocalização ou Focalização Isoelétrica
<i>IGF1</i>	Fator de crescimento do tipo insulina 1
IPG	<i>Immobilized pH Gel</i> – pH Imobilizado em Gel

INCA	Instituto Nacional de Câncer
LA	Linfonodo axilar
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LCHO	Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética
LMW	Marcador de massa molecular
LOH	Perda de heterozigidade
LS	Linfonodo sentinela
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> – Desorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	MAP/Erk cinase
miRNA	microRNA
MM	Massas moleculares
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
MPT	Modificação pós-traducional
MS	Espectrometria de Massa
MSP	<i>Micro Spheres Plates</i> – Detector de Microesferas
mTOR	Alvo mamífero de rapamicina
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i> – Tecnologia de Identificação Protéica Multidimensional
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
<i>NF-kB</i>	Fator nuclear-kB
<i>PDGF</i>	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PDK1	Piruvato desidrogenase cinase 1
PI3K	Posfatidilinositol 3 cinase
PIP2	Posfatidilinositol (4,5) difosfato
PIP3	Posfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i> – Impressão Digital da Proteína
RE	Receptor de Estrógeno
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP	Receptor de Progesterona
S	Svedberg = coeficiente de sedimentação em um campo centrífugo

SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Result</i> – Vigilância Epidemiológica e Resultado Final
smHSP	<i>Small heat shock protein</i> – Proteína de Choque Térmico Pequena
<i>TGFβ</i>	Fator de crescimento transformante β
TNM	Extensão do tumor primário (T); Metástase em linfonodos regionais (N) e Metástase à distância (M)
ToF	<i>Time of flight</i> – Tempo de Voo
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer
<i>VEGF</i>	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
WHS	<i>World Health Statistics</i> – Estatísticas Mundiais de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1 Aspectos epidemiológicos.....	05
2.2 Genética e epigenética de tumores mamários.....	07
2.2.1 Tumores de mama hereditários.....	13
2.3 Carcinogênese mamária.....	15
2.4 Câncer de mama: origem e classificação.....	22
2.5 Linfonodo como valor preditivo.....	30
2.6 Tumor primário de mama e respectivos linfonodos axilares.....	34
2.7 Genômica funcional: proteômica.....	38
2.8 Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.....	42
3. JUSTIFICATIVA.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
4.1 Gerais.....	47
4.2 Específicos.....	47
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1 Abordagem ética e experimental.....	48
5.2 Processamento do material biológico.....	48
5.2.1 Caracterização das amostras.....	48
5.2.2 Coleta do material biológico.....	48
5.2.3 Extração protéica.....	49
5.3 Quantificação das proteínas.....	50
5.4 Eletroforese bidimensional.....	50
5.4.1 Reidratação das tiras de gel.....	50
5.4.2 Focalização Isoelétrica (IEF).....	51
5.4.3 Equilíbrio das tiras.....	51
5.4.4 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS.....	52
5.4.5 Coloração do gel 2D.....	52
5.4.6 Digitalização e análise das imagens.....	53
5.5 Espectrometria de massas.....	53
5.5.1 Seleção de spots em gel 2D.....	53
5.5.2 Análise de espectros de massas.....	54
5.5.3 Identificação das proteínas.....	55
6. RESULTADOS.....	58
6.1 Identificação das amostras.....	58
6.2 Extração e quantificação protéica.....	59
6.3 Metodologias proteômicas.....	60
6.4 Análise dos géis bidimensionais.....	61
6.5 Análise comparativa do conjunto amostral dos linfonodos axilares e dos tumores primários.....	67
6.6 Amostras individualmente analisadas	74
6.6.1 Amostra CP 622.....	74
6.6.2 Amostra CP 627.....	79

6.6.3 Amostra CP 630.....	83
6.6.4 Amostra CP 633.....	88
6.6.5 Amostra CP 641.....	92
6.6.6 Amostra CP 644.....	98
6.6.7 Amostra CP 645.....	105
6.7 Identificação protéica.....	113
6.8 Análise comparativa de tumores primários de mama e linfonodos axilares.....	115
6.9 Grupos funcionais.....	122
7. DISCUSSÃO.....	130
7.1 Parâmetros avaliados.....	130
7.2 Metodologias proteômicas.....	131
7.3 Identificação protéica.....	134
7.4 Proteínas diferenciais.....	138
7.5 Classificação funcional das proteínas.....	139
7.5.1 Citoesqueleto e proteínas associadas (29,93%).....	140
7.5.2 Enzimas metabólicas (7,48%).....	146
7.5.3 Proteínas 'heat shock' e chaperonas moleculares (2,04%).....	150
7.5.4 Proteínas de membrana com múltiplas atividades (1,36%).....	151
7.5.5 Proteínas de ligação (6,80%).....	152
7.5.6 Biossíntese de proteínas (2,04%).....	154
7.5.7 Biossíntese de nucleotídeos (0,68%).....	156
7.5.8 Reguladores do crescimento e da proliferação celular (8,85%).....	157
7.5.9 Degradação protéica (4,08%).....	162
7.5.10 Detoxificação e proteínas redox (2,72%).....	165
7.5.11 Proteínas com atividade extracelular (9,53%).....	166
7.5.12 Outras funções.....	171
7.5.13 Queratinas do citoesqueleto (24,49%).....	172
7.6 Considerações finais.....	175
8. CONCLUSÕES.....	177
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178
ARTIGO.....	194
Resumo.....	194
Abstract.....	195
I. INTRODUÇÃO.....	195
II. MATERIAIS E MÉTODO.....	198
III. RESULTADOS.....	200
IV. DISCUSSÃO.....	211
V. CONCLUSÕES.....	216
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	217
ANEXO.....	219
I. Consentimento livre e esclarecido.....	219

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais freqüente no sexo feminino, representando um problema de saúde pública mundial. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (JEMAL *et al.*, 2010). A incidência estimada para o ano de 2010 e 2011, no Brasil, é 49.240 novos casos da doença, com risco avaliado para região Sul de 64 ocorrências a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2010).

Embora o câncer de mama venha sendo extensivamente estudado durante as últimas décadas, os mecanismos moleculares envolvidos na sua origem e progressão não são plenamente compreendidos (OLDENBURG *et al.*, 2007). Sabe-se que alterações genéticas e epigenéticas que determinam a formação e evolução tumoral ocorrem em duas classes principais de genes responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular: os protooncogenes e os genes supressores de tumor. Modificações na estrutura, no número de cópias ou na expressão destes genes podem determinar o desenvolvimento tumoral (ROSEN *et al.*, 2010).

Uma característica da doença é a rápida proliferação de células anormais que alteram a arquitetura dos tecidos e avançam além de seus limites. As células neoplásicas apresentam, em sua evolução, motilidade e podem interagir diretamente com componentes da matriz extracelular, como as fibras de colágeno e outros derivados do estroma, incluindo fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos. Tumor e ambiente atuam em conjunto, neste contexto, numa interdependência de fatores mitogênicos e tróficos, fornecendo suporte fisiológico para a evolução das células tumorais (WEINBERG, 2008). Eventos subseqüentes podem alterar mecanismos essenciais envolvidos na angiogênese, invasão vascular linfática, metástases regionais ou para órgãos distantes (GOLDBERGER & HUNTER, 2009).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, analisada a partir de critérios clínicos e características biológicas do tumor. O prognóstico de neoplasias mamárias é baseado, atualmente, na avaliação de parâmetros histopatológicos, como acometimento de linfonodos axilares, tamanho do tumor, tipo histológico, grau da patologia, presença de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e amplificação do gene *ERBB2* (SAHAI, 2007). Dentre esses, a caracterização

linfonodal constitui um dos fatores prognósticos mais relevantes, sendo um componente essencial para avaliar o estadiamento tumoral (CAVALLI, 2009). A abordagem cirúrgica da axila através do esvaziamento axilar ou biópsia do linfonodo sentinela é imperativa, seja como finalidade terapêutica ou para avaliar o curso da doença (JACOBS & BALCH, 2009).

Diversos estudos genômicos foram realizados objetivando o aprimoramento na identificação de alterações genéticas relacionadas à compreensão da carcinogênese mamária e evolução metastática (VECCHI *et al.*, 2008; ELLSWORTH *et al.*, 2009). Os genes avaliados, no entanto, não oferecem informações completas sobre a regulação da expressão gênica, modificações pós-traducionais e distribuição espaço-temporal dos produtos protéicos em células e tecidos, essenciais para a elucidação de complexas vias de interação (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

Uma perspectiva particular para a compreensão de mecanismos biológicos subentendidos no câncer de mama combina múltiplas tecnologias proteômicas de alta sensibilidade, como a aplicação de espectrometria de massas e o uso de micro-arranjos protéicos (PITTERI & HANASH, 2007). Nas últimas décadas, os avanços nas análises proteômicas apresentam como principal objetivo a descoberta de biomarcadores moleculares para a detecção precoce da doença, caracterização do perfil de tumores mamários e identificação de novos alvos terapêuticos. A segunda finalidade, não menos relevante, é interpretar vias de sinalização intracelular associadas ao início e progressão de neoplasias (HONDERMARK, 2003). As aplicações desta metodologia devem aproximar a ciência experimental à medicina aplicada (GAST *et al.*, 2009).

Neste estudo, amostras de tumores primários de mama e respectivo linfonodo axilar foram analisados comparativamente, através das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. O objetivo principal consiste em identificar proteínas diferencialmente expressas entre estes tecidos e avaliar o possível envolvimento dos produtos protéicos na evolução de células tumorais, no processo de linfangiogênese e na consolidação de metástases em linfonodos axilares. Estudos proteômicos complementares podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e no tratamento individualizado, além de fornecer subsídios para o delineamento de novos biomarcadores no câncer de mama.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos

O câncer de mama constitui a segunda neoplasia mais freqüente entre as mulheres e a mais letal para o sexo feminino. Estima-se uma incidência anual de um milhão de novos casos de câncer de mama e mais de 500 mil óbitos em todo o mundo (*World Health Organization - WHO*, 2010). Desde a estimativa para o ano de 1990, um aumento no número de casos de câncer de mama tem sido observado em muitos países, acompanhando a urbanização da sociedade e a melhoria nas condições socioeconômicas da população (JEMAL *et al.*, 2010).

Estatísticas indicam um aumento da freqüência de carcinomas mamários tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (*American Cancer Society - ACS*, 2010). As maiores taxas de mortalidade, no entanto, ocorrem em regiões menos desenvolvidas, em países de transição com renda média a baixa, incluindo América Latina, África e Ásia, onde os recursos disponíveis para prevenção, diagnóstico e tratamento são limitados ou inexistentes. Países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, embora apresentem um aumento considerável na incidência, uma redução da mortalidade pode ser observada devido à detecção precoce e ao tratamento adequado das pacientes (WHO, 2010).

A cada ano cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, de acordo com estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2010 (válidas também para 2011), o câncer de mama feminino aparece como o segundo tipo mais incidente entre as mulheres (49.240 casos) (TABELA 01), inferior apenas ao de pele não melanoma (60.440), e apresenta risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sul do país, o câncer de mama constitui a segunda neoplasia mais frequente entre o sexo feminino (64/100.000), apresentando o estado do Paraná e sua capital, Curitiba, números próximos de 2.990 e 730 novos casos para o ano de 2011, respectivamente.

TABELA 01 – ESTIMATIVAS PARA O ANO 2010 DE NÚMERO DE CASOS NOVOS POR CÂNCER NO BRASIL, EM HOMENS E MULHERES, SEGUNDO LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

NOTA: *Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

FONTE: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS.

O risco individual de uma mulher desenvolver câncer de mama ao longo da vida é estimado em 12% (aproximadamente 1 em cada 8 mulheres) (SOERJOMATARAM *et al.*, 2008), sendo o aumento da idade o fator de risco mais importante. De acordo com *Surveillance Epidemiology and End Result (SEER)*, em revisão estatística sobre câncer, a maioria dos casos de neoplasias mamárias ocorre em pacientes do sexo feminino acima de 50 anos de idade, com a maior taxa de incidência entre os 70 e 75 anos. Em homens, entretanto, a ocorrência é rara: estima-se que, para cada 100 novos casos da neoplasia, apenas um (ou menos) é observado no sexo masculino (SILVA *et al.*, 2008).

Em geral, a sobrevida média da população acometida pela doença após cinco anos do diagnóstico é de 61% (INCA, 2010). A ACS estima, contudo, que a taxa de sobrevivência entre pacientes diagnosticadas com câncer de mama localizado (ausência de metástase em gânglios linfáticos ou outros locais) pode chegar a 98%. Caso ocorra migração de células tumorais para regiões adjacentes (em gânglios linfáticos) ou para órgãos distantes a sobrevida em 5 anos diminui em média para 84% e 23%, respectivamente (ACS, 2010).

Apesar de ser considerado um câncer de prognóstico relativamente bom, no Brasil as taxas de mortalidade por neoplasias mamárias continuam elevadas provavelmente em decorrência de diagnóstico tardio. O rastreamento mamográfico a cada dois anos entre mulheres de 50 a 69 anos de idade é a estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde para o controle do câncer de mama, baseadas no Documento de Consenso para Controle do Câncer de Mama de 2010 (INCA, 2010). Evidências indicam que o rastreamento através da mamografia em mulheres nesta faixa etária pode reduzir a mortalidade em 15 - 25% (*World Health Statistics – WHS*, 2008). Em média, este procedimento detecta 80% - 90% dos casos de câncer de mama em mulheres assintomáticas (JEMAL *et al.*, 2010).

A fim de reduzir de modo efetivo a mortalidade por câncer de mama é preciso focar em estratégias de prevenção e detecção precoce (CHUN *et al.*, 2009). Novos programas para o rastreamento de doenças mamárias, factíveis para países com dificuldades orçamentárias, têm sido elaborados para reverter o perfil de mortalidade no cenário mundial (TAN *et al.*, 2007). Segundo WHO, cuidados paliativos relevantes, que consistem na assistência promovida por uma equipe multidisciplinar ativa e integral, também devem ser disponibilizados às pacientes cuja doença não responde mais ao tratamento curativo. O principal objetivo, neste caso, é a garantia da melhor qualidade de vida, tanto para a paciente quanto para seus familiares, através do controle da dor e demais sintomas em suas dimensões psicossociais.

2.2 Genética e epigenética de tumores mamários

O câncer de mama é conseqüência de um processo de múltiplas etapas, resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em uma única célula (NUSSBAUM, 2008). Embora a maioria destas alterações resultem em morte celular, algumas podem envolver os principais genes associados a sobrevivência celular, proliferação, invasão, motilidade, resistência a drogas e outras características malignas. As mudanças que determinam a formação e progressão tumoral ocorrem em duas classes principais de genes envolvidos no controle do ciclo celular: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Enquanto os primeiros

promovem a proliferação celular ordenada, a atuação dos genes supressores de tumor mantém essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular (OSBORNE *et al.*, 2004).

O controle das atividades celulares normais é realizado por diversos genes, entre eles os proto-oncogenes. Os oncogenes são derivados de proto-oncogenes que sofreram mutações ativadoras e passaram a apresentar ganho de função ou expressão aumentada. A ativação desses genes pode ocorrer por meio de translocações cromossômicas, ampliações gênicas, superexpressão ou, ainda, mutações de ponto. As oncoproteínas constituem variantes alteradas de proteínas normais, podendo interferir no controle da proliferação celular em diversos níveis; interagindo com fatores de crescimento fora da célula, atuando em receptores na superfície celular, emitindo informações da membrana celular para o núcleo e, ainda, agindo diretamente no núcleo da célula (WEINBERG, 2008). Oncogenes também podem atuar em cooperação com outras alterações genéticas ou epigenéticas (OSBORNE *et al.*, 2004).

Numerosos oncogenes foram caracterizados apresentando comportamentos heterogêneos, por sua vez, associados a diversas neoplasias em humanos, como *HRAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR*, *ERBB2*, *BCL2*, *ABL1* e *MDM2* (KOPNIN, 2000). No câncer de mama, entretanto, um número relativamente pequeno é considerado fundamental para a progressão deste tipo de neoplasia, atuando, principalmente, em componentes oncogênicos do sistema de sinalização celular da cascata *ERBB2* (OSBORNE *et al.*, 2004).

A família *ERBB* é composta por quatro tipos de receptores intimamente ligados: *EGFR* (*HER1*), *ERBB2* (*HER2*), *ERBB3* (*HER3*) e *ERBB4* (*HER4*). Cada receptor é composto por um domínio extracelular, em que o ligante se associa, um segmento transmembrana α -hélice e um domínio intracelular tirosina quinase. A dimerização dos receptores é um requisito essencial para desempenhar a função e a atividade de sinalização. A associação pode ocorrer entre dois diferentes receptores *ERBB* (heterodímeros) ou entre duas moléculas do mesmo receptor (homodímeros) (BASELGA & SWAIN, 2009).

A amplificação ou superexpressão do oncogene *ERBB2*, facilita a formação de dímeros e constitui um potencial mecanismo para aumentar a transdução de sinal, fosforilando e desfosforilando proteínas transmembranas intermediárias e

intracelulares, que dirigem a proliferação e sobrevivência da célula (ROSS *et al.*, 2009). O número aumentado de receptores, muito sensíveis e pouco específicos, responderão a diversos estímulos. O heterodímero *ERBB2/ERBB3* é considerado o mais ativo para a sinalização em tumores com ampliações de *ERBB2*. Em outra situação, *ERBB2* pode ser afetado por mutações pontuais ou pequenas deleções que originam receptores constitutivamente ativos, disponível para dimerização sem que haja associação de um ligante (BASELGA & SWAIN, 2009).

Duas principais vias de sinalização ativadas por dímeros da família *ERBB* são: MAPK e PI3K-Akt (FIGURA 01). A MAPK e sua relação com a família *ERBB* é bem descrita. Neste caso particular, Ras ativa a cinase Raf, que fosforila e ativa MEK e, por sua vez, passa a fosforilar e ativar MAPKs. Sua ativação pode regular a tradução e fatores de transcrição no núcleo, envolvendo genes que dirigem a proliferação celular, diferenciação, migração e angiogênese (BASELGA & SWAIN, 2009).

A sinalização através da via PI3K-Akt pode apresentar vários destinos finais para a célula, sendo sinais de sobrevivência e anti-apoptóticos os principais da via. A ativação e fosforilação de receptores de fator de crescimento facilita o recrutamento de um complexo de sinalização na membrana e, neste caso, PI3K se liga diretamente a resíduos de fosfotirosina, formando PIP2 e PIP3. O último, por sua vez, possibilita a ligação de moléculas, como Akt (também chamada PKB) e proteínas de troca de nucleotídeo Rho, na membrana plasmática. Akt/PKB é capaz de ativar *GSK3 β* (estimulando a proliferação e sobrevivência), *MTOR* (estimulando a síntese proteica e o crescimento celular) e NF- κ B (suprimindo a apoptose), ainda atua inativando *BAD* e p27. A perda da função de *PTEN* (reprime a proliferação celular), responsável pela atividade desregulada de Akt/PKB, é observada em células tumorais, incluindo carcinomas de mama (WEINBERG, 2008).

A estratégia terapêutica utilizada em casos de superexpressão de *ERBB2* (freqüentemente 10 a 100 vezes acima do normal em tumores mamários) envolve a imunização passiva pelo anticorpo monoclonal *trastuzumab* (Herceptin®; F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Como mecanismo de ação, liga-se à porção extracelular do receptor do fator de crescimento epidermal e media uma citotoxicidade anticorpo-dependente em células que superexpressam o gene. Os mecanismos precisos pelos quais as células tumorais são eliminadas, contudo, continuam controversos (WEINBERG, 2008).

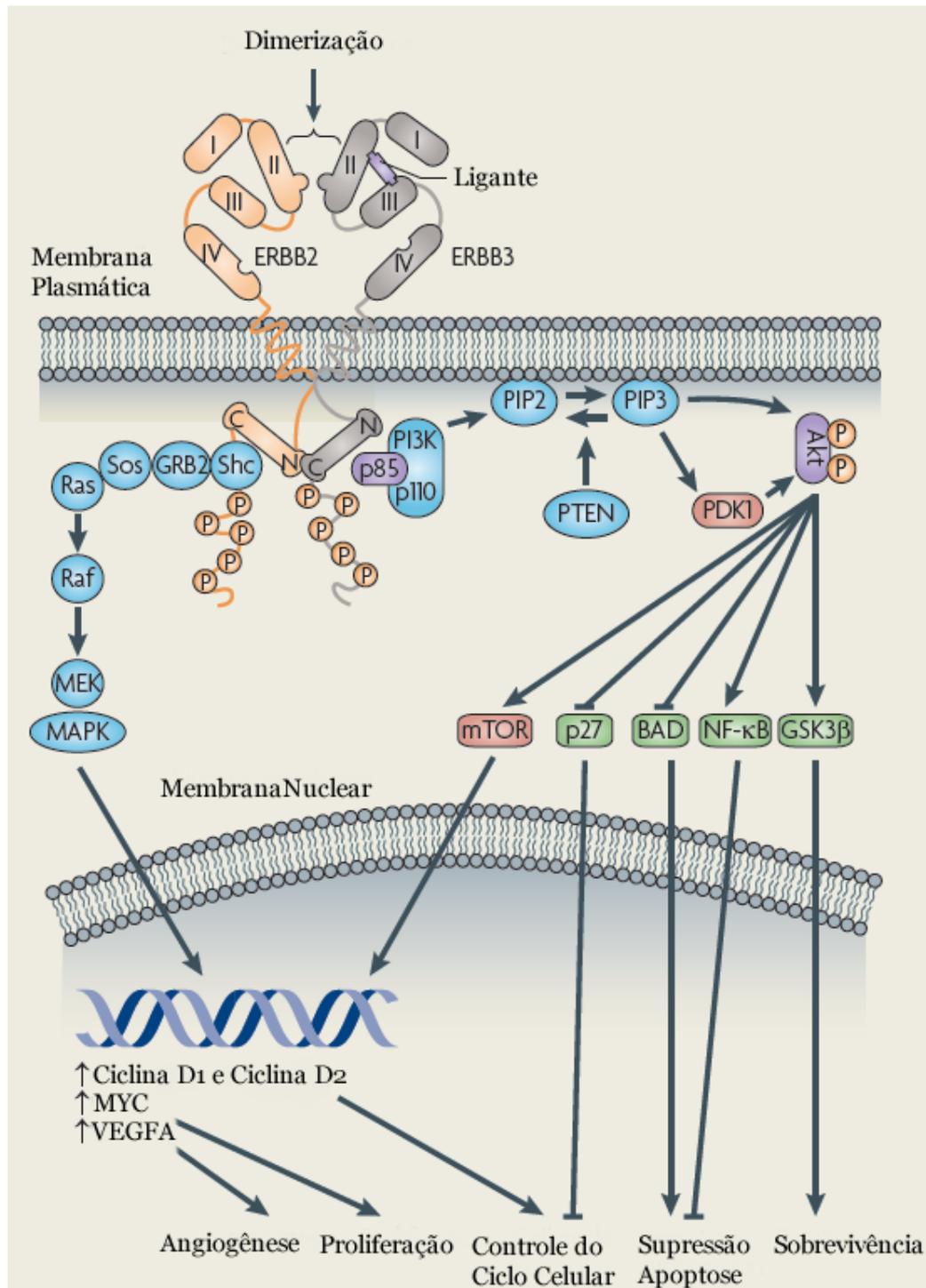


FIGURA 01 – FORMAÇÃO DE DÍMERO *ERBB2/ERBB3* E SINALIZAÇÃO *DOWNSTREAM*. A associação do ligante e subsequente formação de dímeros ErbB iniciam a sinalização através de uma matriz complexa de vias. De modo simplificado, a dimerização resulta em fosforilação cruzada dos parceiros, criando sítios de encaixe que permitem o recrutamento de componentes para a sinalização downstream, que controlam uma variedade de processos intracelulares. Ocorre a ativação das vias MAPK e PI3K-Akt, que atuam diretamente na proliferação e diferenciação celular, migração e angiogênese.
 FONTE: modificado de BASELGA & SWAIN, 2009.

O proto-oncogene *MYC* codifica uma proteína nuclear que está envolvida no metabolismo de ácidos nucléicos e na mediação da resposta celular a fatores de crescimento, diferenciação e apoptose. Quando mutado, o oncogene é capaz de induzir danos no DNA, promovendo rearranjos cromossômicos complexos, alterando de forma inapropriada a progressão do ciclo celular e prejudicando o reparo do DNA (DOMINGUEZ-SOLA *et al.*, 2007). De acordo com OSBORNE *et al.* (2004), a amplificação ou a superexpressão do *MYC*, evidenciado em 15 a 20% dos tumores mamários, apresenta uma relação direta com pior prognóstico e maior agressividade da neoplasia.

A ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor constituem eventos complementares necessários à transformação neoplásica. A segunda classe de genes, os supressores de tumor, atua regulando negativamente a proliferação celular ou positivamente a morte celular programada (apoptose), codificando proteínas que atuam na manutenção da integridade do genoma e protegendo as células de um crescimento desordenado (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Existem numerosos genes supressores de tumor identificados, com predisposição a desenvolver varias neoplasias quando mutados, dentre eles *RB1*, *APC*, *TP53*, *ATM*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *VHL*, *WT1*, *MLH1*, *MSH2*, *NF1*, *NF2*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6* (BUNZ, 2008; KOPNIN, 2000). Estudos comprovam o envolvimento de, principalmente, *BRCA1* e *BRCA2* na maior predisposição ao câncer de mama hereditário.

Os genes supressores de tumor codificam proteínas regulatórias com a finalidade de impedir a progressão do ciclo celular, em caso de dano no DNA (OSBORNE *et al.*, 2004). Alterações que levam a uma inativação destes genes liberam a célula da inibição nos pontos de checagem do ciclo celular, levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa. Essa classe de genes pode ser dividida em dois grupos: *Gatekeepers* e *Caretakers*. *Gatekeepers* ou genes protetores (*RB1*, *APC*, *TP53*) regulam diretamente o ciclo celular, enquanto *Caretakers* ou genes de manutenção (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*) atuam reparando danos no DNA, mantendo a integridade genômica (OLDEMBURG *et al.*, 2007).

A relação entre genes supressores de tumor e o câncer foi inicialmente proposta em 1971, quando Alfred Knudson elaborou a *Hipótese dos Dois Eventos*

(*Two Hits Model*) para explicar a ocorrência esporádica e familiar do retinoblastoma, um raro câncer intra-ocular que se manifesta na infância. A descoberta de genes supressores de tumor contribuiu de modo expressivo para elucidar mecanismos biológicos subentendidos em síndromes de câncer familiar. A herança de um alelo mutado nesses genes é frequentemente compatível com o desenvolvimento embrionário e torna-se aparente ao longo da vida do indivíduo, quando ocorre a perda do alelo selvagem. Apenas um evento é necessário, neste caso, para o indivíduo desenvolver o fenótipo tumoral (OSBORNE *et al.*, 2004). A eliminação do segundo alelo pode estar associada à deleção intersticial, recombinação mitótica, não disjunção dos cromossomos durante a divisão celular, eventos de perda de heterozigosidade (LOH) ou silenciamento epigenético via metilação do promotor (WEINBERG, 2008).

Além de eventos genéticos, alterações epigenéticas podem estar envolvidas na carcinogênese mamária. Mudanças no padrão de metilação de ilhas CpG que ocorrem em regiões promotoras de genes supressores de tumor e de outros genes associados ao câncer podem contribuir para o silenciamento transcricional e, de modo geral, estar envolvidas na progressão de neoplasias (READ & DONNAI, 2007). A identificação do padrão de metilação em células normais, tumores primários e metástases podem fornecer subsídios para o entendimento de eventos epigenéticos envolvidos ainda na evolução dos tumores mamários (SHINOZAKI *et al.*, 2005).

Mais recente, a participação de microRNA (miRNA) na regulação de processos celulares fundamentais, como desenvolvimento, diferenciação, proliferação e apoptose, deve esclarecer outros mecanismos implicados na origem de vários tipos de câncer. As causas e conseqüências da desregulação determinada por miRNA em tumores também podem, futuramente, contribuir para a aplicação de novas drogas terapêuticas, com baixa especificidade e ação ampla em diferentes alvos (CROCE, 2009).

Estudos utilizando metodologias com maior poder de resolução vêm demonstrando uma considerável variabilidade genética entre tumores de diferentes indivíduos, potencialmente capaz de definir subpopulações com probabilidade diferenciada de eventos mutacionais. Os resultados, no entanto, são controversos. O seqüenciamento de genes não oferece informações sobre a regulação da expressão

gênica, modificações pós-traducionais e distribuição espaço-temporal do produto protéico em células e tecidos, essencial para a elucidação de complexas vias de interação. Novas metodologias de pesquisa, envolvendo transcritos de RNA e redes de proteínas, podem ser utilizadas para melhor compreensão, detecção e tratamento do câncer (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

2.2.1 Tumores de mama hereditários

Algumas mutações genéticas herdadas ou polimorfismos podem aumentar a predisposição ao câncer de mama, em associação com outros fatores de risco. O câncer de mama hereditário corresponde 5-10% dos casos e podem ser explicados por mutações germinativas raras em genes de alta penetrância, como *BRCA1* e *BRCA2* (NUSSBAUM *et al.*, 2007). Outros genes de susceptibilidade ao câncer de mama hereditário são: *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CDH1*, *CHEK2* e *STK11 (LKB1)*. O conjunto de todos estes genes é responsável por menos de 25% dos casos de tumores de mama hereditários, indicando a existência de vários genes de menor penetrância ainda desconhecidos (BRADBURY & OLOPADE, 2007).

O risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias em mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* pode chegar a 85%, antes dos 70 anos de idade. Para mutações em *BRCA2*, o risco é pouco inferior e, em geral, em idades mais avançadas. Apesar do risco cumulativo da manifestação de um tumor em pacientes que herdaram uma cópia mutada de *BRCA1* ser maior, a ocorrência de um tumor ao longo da vida, também, depende da influência de outros fatores de risco. A presença de histórico familiar de câncer de mama e ovário, manifestação precoce da neoplasia, a bilateralidade e características histopatológicas específicas, constituem fatores sugestivos da presença de mutações nestes genes (AMENDOLA & VIEIRA, 2005).

O gene *BRCA1* está localizado no cromossomo 17q21 e o *BRCA2* no cromossomo 13q12. Esses genes, também considerados genes *caretakers*, foram classificados como supressores de tumor devido à perda da heterozigose observada em indivíduos portadores de mutações nos mesmo. Durante a última década, muitas

das funções celulares e bioquímicas das proteínas dos genes *BRCA1/2* foram identificadas. *BRCA1* atua no reparo do DNA, ubiquitilação de proteínas, remodelamento da cromatina e controle dos pontos de checagem do ciclo celular. O gene *BRCA2* está envolvido no reparo de quebras de dupla fita no DNA através da recombinação homóloga, mas pouco se sabe ainda sobre suas funções (OLDENBURG *et al.*, 2007).

O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17p13.1 e codifica uma proteína envolvida em diversas vias que controlam a proliferação celular, apoptose e reparo do DNA. Mutações no gene *TP53* estão associadas à síndrome de *Li-Fraumeni*, uma doença autossômica rara com manifestação em diversos tipos de câncer, dentre eles, o câncer de mama (OSBORNE *et al.*, 2004). Em famílias com a síndrome de *Cowden*, uma síndrome autossômica dominante rara, mutações no gene *PTEN*, um supressor de tumor, têm sido identificadas. O risco de uma mulher com esta doença desenvolver câncer de mama invasivo durante sua vida é de 25-50%, sendo que a maioria dos casos ocorre entre 30 e 35 anos de idade (OLDENBURG *et al.*, 2007).

Outro exemplo de supressor de tumor, o gene *ATM* possui um importante papel no reconhecimento de dano e no reparo do DNA. A inativação deste gene em indivíduos portadores de mutações na sua seqüência manifesta a desordem rara ataxia-telangiectasia (AT). A doença autossômica recessiva é caracterizada por degeneração cerebelar, dilatação de vasos sanguíneos, imunodeficiência, instabilidade cromossômica e predisposição a diversas neoplasias. O gene *CDH1* sintetiza uma proteína envolvida na diferenciação e na manutenção da arquitetura dos tecidos epiteliais. Mutações germinativas em *CDH1* manifestam a síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário (HDGC-síndrome), com risco aumentado de desenvolver câncer de mama (OLDENBURG *et al.*, 2007).

O gene *CHEK2* codifica uma proteína quinase envolvida no ciclo celular e no reparo do DNA. Mutação neste gene confere à mulheres portadoras uma chance duas vezes maior de desenvolver câncer de mama. Mais raras, mutações no gene *STK11* foram identificadas e associadas com a síndrome *Peutz-Jeghers*. Esta síndrome é responsável por um pequeno número de casos de câncer de mama, no entanto, mulheres com alterações neste gene apresentam um risco maior de desenvolver neoplasias mamárias (OLDENBURG *et al.*, 2007).

2.3 Carcinogênese mamária

O câncer constitui um dos maiores desafios da ciência, da prevenção à descoberta de mecanismos moleculares envolvidos na sua evolução, tratamento e cura. A pesquisa de variáveis associadas ao desenvolvimento do câncer de mama pode contribuir para estabelecer componentes de predisposição implícitos na tumorigenicidade. Atualmente existem diversos fatores de risco já descritos associados ao desenvolvimento desta neoplasia, como: idade da mulher, história familiar, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, o uso prolongado de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e obesidade (OLDENBURG *et al.*, 2007; SHANTAKUMAR *et al.*, 2007; CASEY *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008). O consumo de drogas sociais a exemplo do álcool e do tabaco também podem aumentar a predisposição, quando em excesso e por longo período (ZHANG *et al.*, 2007; COLLISHAW *et al.*, 2009).

A interação gene-ambiente e a variação interindividual contribuem diretamente para o aumento da predisposição ao câncer de mama. Análises das variáveis envolvidas no desenvolvimento do câncer, como exposição a fatores exógenos seguida de alterações genéticas e epigenéticas (principalmente em oncogenes e genes supressores de tumor), tornam-se fundamentais para a construção de hipóteses precisas para a análise da origem e evolução de neoplasias (LOEB & HARRIS, 2008).

No aspecto clínico do câncer de mama, a progressão está associada a uma cascata de eventos genômicos que direcionam a transformação de células normais a derivados malignos, podendo ser descritos em termos biológicos como exemplo análogo ao modelo darwiniano. As unidades envolvidas, contudo, são células individuais que competem entre si em uma população de células, em vez de organismos dentro de uma espécie. Isso faz sentido uma vez que fatores biológicos intrínsecos, ou mutações aleatórias, atuam no tumor primário selecionando a habilidade de várias células proliferarem em um microambiente particular, conferindo uma vantagem adaptativa (HANAHAN & WEIMBERG, 2000).

No modelo sugerido, de expansões clonais, uma mutação aleatória origina uma célula com capacidade de crescimento e sobrevivência particularmente

vantajosa. Essa célula e seus descendentes então proliferam de modo eficiente, superior ao de células vizinhas, gerando uma população clonal que domina determinada região do tecido e substitui as células pré-existentes. Posteriormente, outra mutação favorável deve ocorrer dentro da população clonal. A célula agora, com dupla mutação, constituirá um novo subclone que se expandirá e, finalmente, dominará o local da população precursora. Após o estabelecimento da população mais recente, uma terceira mutação vantajosa pode ocorrer, e o processo de expansão clonal e sucessão se repetirá. Alguns subclones, ao acaso, podem adquirir potencial tumorigênico durante a evolução.

O atual curso da progressão tumoral, por outro lado, apresenta variáveis complexas a serem consideradas. No modelo mais aceito, à medida que a progressão de células tumorais avança, os genomas de tumores freqüentemente se tornam muito mais instáveis e as mutações adquiridas em cada geração aumentam em taxas significativas. Tal variabilidade implica que os genomas das células tumorais são bastante plásticos e mudam continuamente de forma aleatória a uma taxa que excede a habilidade de seleção (darwiniana) para eliminar clones geneticamente menos adaptados. Conseqüentemente, a massa tumoral apresenta grande número de setores distintos, cada qual com populações de subclones geneticamente diferentes (FIGURA 02).

A descrição do modelo de evolução darwiniano para a progressão do câncer é, sem dúvida, simples, uma vez que alterações epigenéticas herdáveis, como eventos de metilação no DNA, não foram antes considerados para direcionar a evolução de uma espécie. O trajeto linear de sucessão clonal inicialmente proposto também simplifica a realidade observada em neoplasias. De acordo com o primeiro modelo, a análise de células dentro de um tumor pré-maligno ou maligno deveria mostrar um único tipo celular geneticamente homogêneo dominando a população, uma vez que o mesmo cresce e desloca o clone de células precedentes. Isso normalmente não é observado na maioria dos tumores. O segundo modelo, contudo, reflete a heterogeneidade observada na maioria dos casos (WEINBERG, 2008).

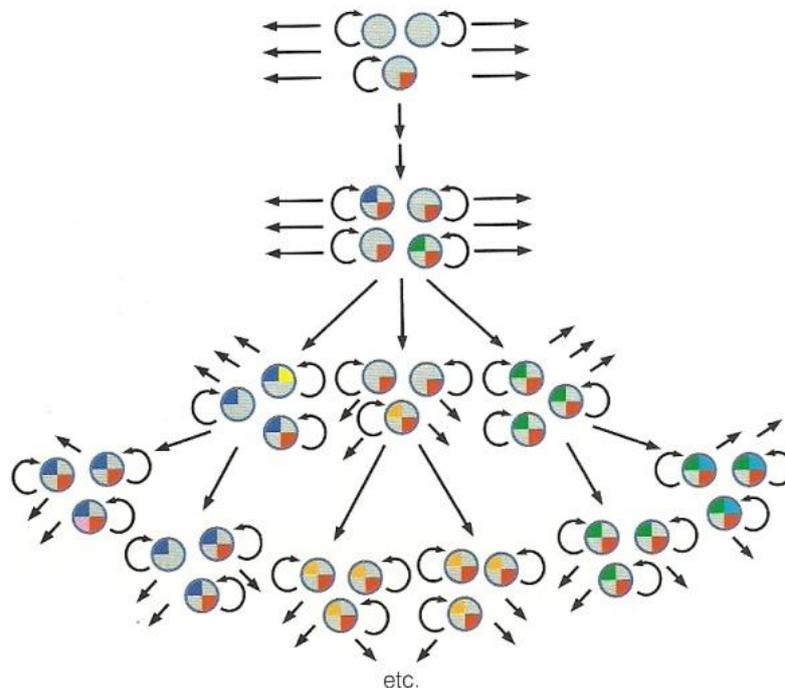


FIGURA 02 – DIVERSIFICAÇÃO CLONAL REPRESENTADA POR ALTAS TAXAS DE MUTAÇÃO. Com a progressão tumoral, os genomas de populações de células se tornam instáveis. O aumento da taxa de mutação torna a seleção darwiniana ineficaz e o tumor, conseqüentemente, apresenta setores distintos dominados por subclones geneticamente diferentes. Neste diagrama, apenas as populações de células-tronco tumorais estão representadas. As flechas apontando para fora indicam a produção de um grande número de células neoplásicas geneticamente idênticas. FONTE: WEINBERG, 2008.

Os reais problemas que impedem a classificação comum de neoplasias humanas são resultantes da iniciação *versus* promoção do câncer, eventos claramente divergentes, complexos e heterogêneos. Uma variedade fenotípica de tumores humanos, entretanto, permite sugerir a existência de atributos essenciais adquiridos pelas células durante a evolução para os estágios de malignidade (FIGURA 03). Esses são: (1) redução da dependência de fatores de crescimento mitogênicos exógenos; (2) resistência adquirida a sinais inibitórios de crescimento; (3) habilidade de multiplicação indefinida, isto é, a proliferação de células imortalizadas; (4) susceptibilidade reduzida a apoptose; (5) habilidade de gerar novos vasos sanguíneos – angiogênese; (6) aquisição de habilidade invasiva e metastática; e outra, ainda recente, (7) habilidade de desviar o sistema imune e não ser eliminada (não mostrado na figura) (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

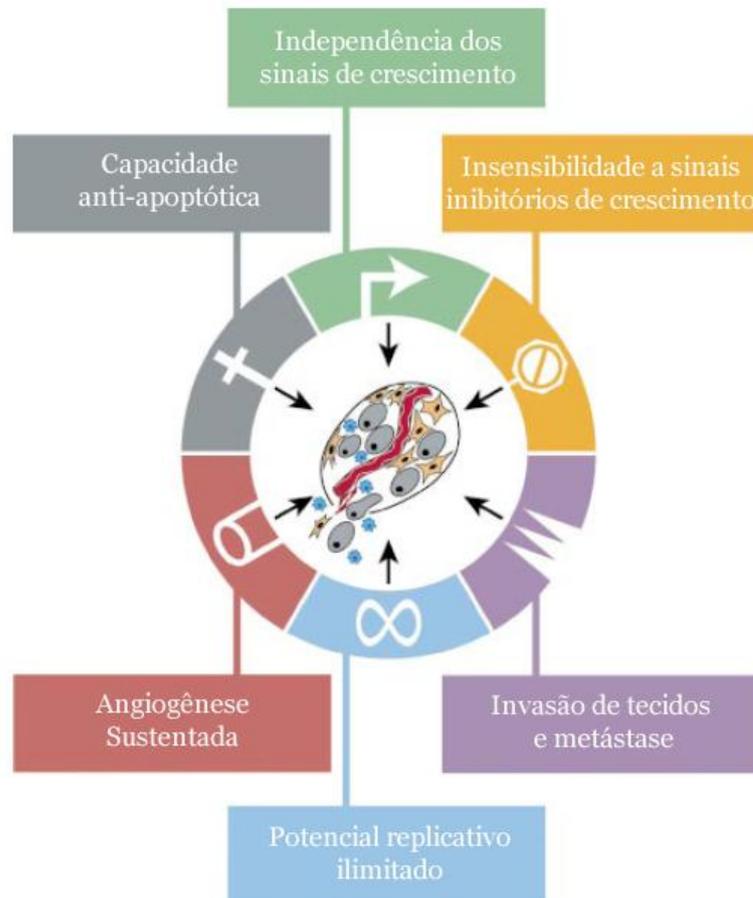


FIGURA 03 – CAPACIDADES ADQUIRIDAS POR CÉLULAS CANCEROSAS. As funções adquiridas durante o desenvolvimento do câncer: independência dos sinais de crescimento; capacidade anti-apoptótica; insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento; potencial replicativo ilimitado; angiogênese sustentada; invasão de tecidos e metástase.

FONTE: modificado de HANAHAHAN & WEINBERG, 2000.

(1) Independência de sinais de crescimento:

Células normais requerem um sinal mitogênico antes de passar de um estágio quiescente para um estágio ativo de proliferação. Esses sinais são transmitidos através de receptores de sinalização transmembrana que se ligam a moléculas de diferentes classes, como fatores de crescimento difusos, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão/interação célula a célula. Enquanto muitos fatores de crescimento (GF) são mitógenos solúveis produzidos por um tipo de célula para estimular a proliferação de outra, muitas células cancerosas adquirem

habilidade de sintetizar os próprios GFs, criando um *feedback* positivo de sinalização de estimulação autócrina. A superexpressão de receptores, também observada em tumores, permite que as células se tornem hiper-responsivas a níveis ambientais de GF que normalmente não induziria a proliferação. Em outro caso, uma independência de ligante pode ser gerada pela alteração estrutural de receptores, constitutivamente ativos (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

(2) Insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento:

Os sinais antiproliferativos podem ser enviados por inibidores solúveis ou imobilizados na matriz extracelular e na superfície de células vizinhas, que se associam aos receptores de superfície celular transmembrana. A sinalização pode direcionar para um estágio celular quiescente, proliferativo ou, ainda, pós-mitótico/diferenciado. Em nível molecular, a proteína pRB desempenha normalmente papel fundamental no bloqueio da proliferação e atua numa complexa via de sinalização que impede o desenvolvimento do ciclo celular. Alterações em componentes da via principal, relacionada a esta proteína, permitem a proliferação e tornam a célula insensível aos fatores antiproliferativos. A participação de outros elementos, como *TGFβ* (fator de crescimento transformante β) e proteínas ciclinas, também conferem relevância a este sistema (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

(3) Potencial replicativo ilimitado:

A senescência, como mecanismo natural, é um processo metabólico ativo do envelhecimento celular. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve a desintegração dos telômeros e ativação de genes supressores de tumor. O processo de encurtamento dos telômeros tem sido atribuído à incapacidade da RNA polimerase completar a replicação nas extremidades 3' da dupla fita de DNA, durante a fase S do ciclo celular. As extremidades desprotegidas podem, então, se fundir, gerando cromossomos anômalos e uma desordem cariotípica generalizada que sinaliza para a morte celular, no denominado estado de crise. As células em senescência perdem, portanto, a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares. Células tumorais, por outro lado, apresentam como estratégia a capacidade de reativar a telomerase, mantendo as extremidades teloméricas, e se multiplicar de forma ilimitada (imortalização). Além disso, são capazes de evitar o estado de crise e continuar o ciclo celular, instável genomicamente (WEINBERG, 2008).

(4) Capacidade anti-apoptótica:

O programa apoptótico está presente de forma latente em todas as células. A via de apoptose é, normalmente, acionada em resposta a estresses celulares fisiológicos, incluindo anoxia, desbalanço na maquinaria de sinalização intracelular e dano genômico. Uma vez ativado, o programa é coreografado por uma série de passos que incluem o rompimento da membrana celular, eliminação do citoplasma, degradação dos cromossomos e fragmentação do núcleo.

Segundo *Hanahan & Weinberg* (2000) a resistência a apoptose é a maior barreira a ser rompida pelo câncer. As células cancerosas, no entanto, apresentam numerosas formas de inativar a maquinaria apoptótica a fim de sobreviver e proliferar. Dentre os mecanismos utilizados estão incluídos: ativação da via Akt/PKB; aumento de proteínas antiapoptóticas relacionada a *BCL2*; inativação de p53 ou reguladores *upstream* desta proteína; metilação de promotores de uma variedade de genes pró-apoptóticos; interferência do citocromo c liberado por mitocôndrias; e a inibição de caspases. O circuito que dirige a apoptose, contudo, ainda não é plenamente compreendido.

(5) Angiogênese:

Uma vez que os tecidos são formados, o crescimento de novos vasos sanguíneos é transitório e cuidadosamente regulado. Sinais positivos e negativos controlam a angiogênese. Parte da sinalização é proveniente de fatores solúveis e seus receptores na superfície de células endoteliais; integrinas e moléculas de adesão mediando associações célula-matriz e célula-célula. Em nível bioquímico há uma interdependência de vários tipos de fatores mitogênicos e tróficos, como exemplo, as células epiteliais de um carcinoma frequentemente liberam PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta), para as quais células estromais – especialmente fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos – possuem receptores; as células estromais alternam liberando *IGF1* (fator de crescimento do tipo insulina 1), o qual beneficia o crescimento e sobrevivência das células tumorais. Em muitos casos há, ainda, evidências do aumento da expressão de *VEGF* (fator de crescimento endotelial vascular) e *FGF* (fator de crescimento fibroblástico) comparado com tecidos normais e, em outros, uma expressão endógena diminuída de inibidores como trombospondina 1 (*THBS1*) ou β interferon (*INF β*). Ambas podem ocorrer

simultaneamente durante a neovascularização, o pré-requisito para a rápida expansão clonal e evolução dos tumores (WEINBERG, 2008).

(6) Metástase:

Algumas células tumorais adquirem mobilidade e podem invadir tecidos adjacentes e alcançar sítios mais distantes para a formação de novos tumores. As estratégias utilizadas no processo metastático envolvem alterações físicas entre células e meio ambiente, além da ativação de proteases extracelulares. A cascata invasão-metástase segue eventos sucessivos de invasão local, intravasão, transporte, extravasão, formação de micrometástases e colonização. Muitos desses passos podem ser executados por células tumorais que ativam a transição epitelial-mesenquimal (EMT), normalmente usados por células na embriogênese inicial e durante o processo de cicatrização de feridas (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

EMT envolve perda de expressão de genes da célula epitelial e aquisição da expressão de genes mesenquimais. Os últimos genes expressos permitem que a célula adquira capacidade invasiva e de mobilidade. A mobilidade celular é, então, regulada por uma série de proteínas da família Rho que são ativadas por vias de transdução de sinais citoplasmáticos e controle da montagem do citoesqueleto de actina. A invasividade celular, por fim, é controlada em grande parte por metaloproteinases (MMP) que funcionam degradando componentes da matriz extracelular. Essas enzimas são freqüentemente produzidas por células do estroma associado ao tumor (WEINBERG, 2008).

Para muitos tipos de células tumorais, contudo, a habilidade de colonizar é um traço adquirido independente da tumorigenicidade. Enquanto a grande maioria dos passos iniciais da cascata invasão-metástase são semelhantes em vários tumores, o último passo, a colonização, depende de interações ainda mais complexas entre vários tipos celulares em metástase e o microambiente do tecido hospedeiro alcançado. Neste caso, a seleção darwiniana favorecendo determinada célula tumoral circulante é clara e óbvia. Alguns descendentes celulares apresentam como resultado, sucesso em proliferar em locais distantes enquanto outras micrometástases seriam selecionadas (WEINBERG, 2008).

(7) Resposta ao sistema imunológico:

O sistema imune apresenta capacidade intrínseca de desenvolver o reconhecimento de antígenos de tecidos normais e aqueles expressos por

elementos estranhos, especificamente, agentes infecciosos. Muitas ações do sistema imune direcionadas ao reconhecimento e eliminação de agentes infecciosos podem também ser usadas para o ataque de células tumorais. Os mecanismos de indução de tolerância, entretanto, complicam essas respostas, já que a maior parte dos antígenos de células tumorais é componente de proteínas celulares normais. As respostas do sistema imune a tumores ainda são mal compreendidas, e a multiplicidade dos reguladores cria a oportunidade de ativar respostas antitumorais de várias formas (WEINBERG, 2008).

2.4 Câncer de mama: origem e classificação

A glândula mamária apresenta estrutura celular complexa, com um sistema integrado de renovação do tecido. A mama é constituída de um epitélio secretor (parênquima) envolvido por um estroma de tecido conectivo e adiposo e uma rede de capilares. A porção parenquimal é formada por dois tipos de células epiteliais: as luminais glandulares e as mioepiteliais basais. Essas células, em conjunto com o estroma, produzem os componentes da matriz extracelular, que assim como hormônios e fatores de crescimento são essenciais para o crescimento, funcionamento e morfogênese da glândula mamária (GUIMARÃES, 2008). Em menor número, também estão presentes células tronco epiteliais mamárias, capazes de originar células luminais e mioepiteliais e formar novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (STINGL & CALDAS, 2007).

A maior parte dos casos de neoplasias mamárias inicia a proliferação em células de revestimento dos ductos e lóbulos mamários, os denominados carcinomas ductais (CD) e carcinomas lobulares (CL), respectivamente (FIGURA 04). Outras doenças da mama menos comuns incluem tumores mucinosos, inflamatórios, medulares, tubulares, papilares e filóides (GUIMARÃES, 2008).

As primeiras lesões aparentes no tumor constituem as hiperplasias, onde células epiteliais apresentam alterações estruturais, mas não atipia citológica, e poucas alterações genéticas. À medida que a doença progride para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), a atipia citológica torna-se proeminente, com aumento significativo no índice mitótico e nas alterações genéticas. As células tumorais podem, então, se estabelecer

na área de origem ou romper a membrana basal. Os carcinomas *in situ* são caracterizados por apresentarem proliferação de células que permanecem restritas aos ductos ou lóbulos mamários. Dentro deste grupo, os carcinomas ductais *in situ* (CDIS) podem ser subclassificados seguindo padrões histomorfológicos do tecido, com os tipos mais freqüentes designados comedo, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido (BATEMAN, 2007).

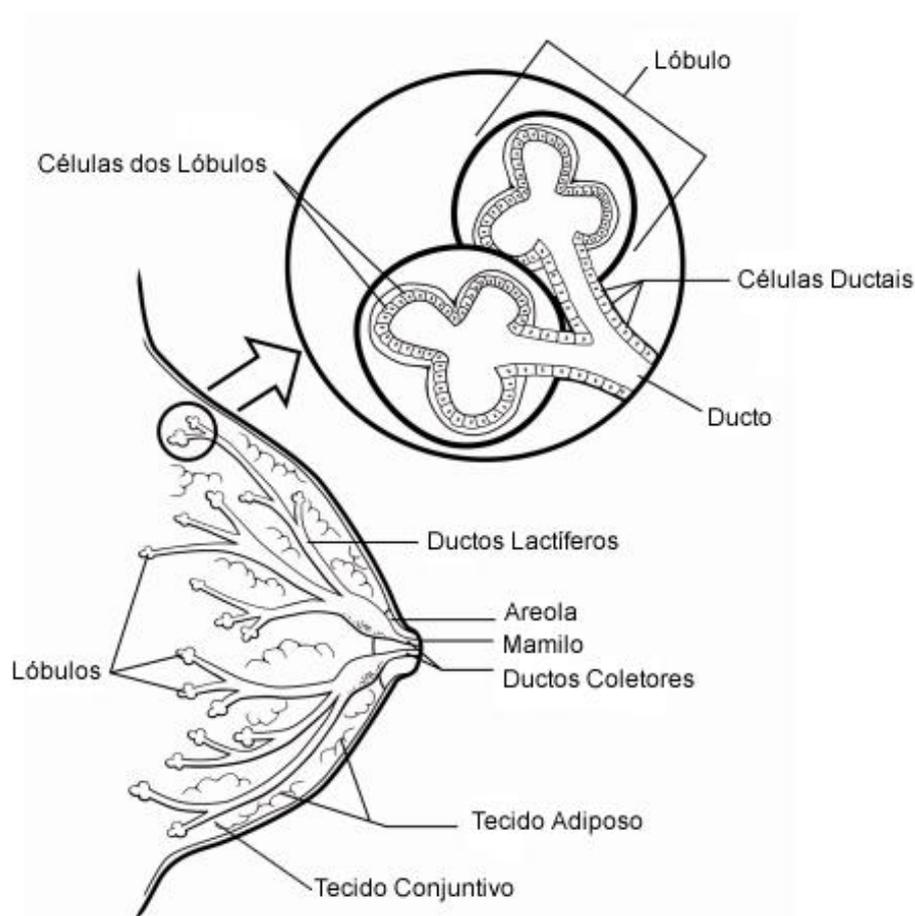


FIGURA 04 – ESTRUTURA INTERNA DA MAMA. Estão identificados lóbulos, ductos, aréola, mamilo, tecido adiposo e tecido conjuntivo. Ampliado: lóbulos e ductos, e suas respectivas células constituintes.

FONTE: modificado de ACS, 2010, disponível em: <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/OverviewGuide/breast-cancer-overview>

O tipo ductal apresenta uma incidência de cerca de 23% nos tumores de mama identificados, enquanto os carcinomas lobulares *in situ* (CLIS) ocorrem em aproximadamente 3% das pacientes. A evolução destas neoplasias pode ser muito

variável e nem todos os CIS evoluem para o perfil invasor. O risco de invasividade, no entanto, é maior em mulheres que apresentam um CIS primário (EHEMAN *et al.*, 2009).

O diagnóstico de um carcinoma invasivo (CI), ao contrário do *in situ*, é determinado pela capacidade de invadir a membrana basal e metastatizar para regiões distantes (BATEMAN, 2007). Os carcinomas ductais invasivos (CDI) são os mais frequentes e compreendem 65 a 80% dos casos de câncer de mama. Estes podem variar em tamanho, aparência e consistência, dependendo da composição da lesão. O carcinoma lobular invasor (CLI) abrange cerca de 10% de todos os carcinomas de mama diagnosticados. Algumas neoplasias mistas, ductal/lobular, também são observadas na população com taxas variadas de incidência (EHEMAN *et al.*, 2009).

A classificação de tumores malignos, incluindo lesões malignas da mama, utiliza o sistema TNM que avalia prioritariamente a classificação por extensão anatômica da doença, determinada clínica e histologicamente (quando possível); onde *T* se refere à extensão do tumor primário, *N* à ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais, e *M* à ausência ou presença de metástase à distância (FIGURA 05). No caso de tumores primários múltiplos sincrônicos em uma mesma mama, o tumor com a maior categoria T deve ser usado na classificação. Cânceres de mama bilaterais e simultâneos devem ser classificados de modo independente para permitir a divisão das neoplasias por tipo histológico. Este sistema segue padrões estabelecidos pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC, 2010) (QUADRO 01), no entanto, aplica-se apenas a 80% dos tumores da mama.

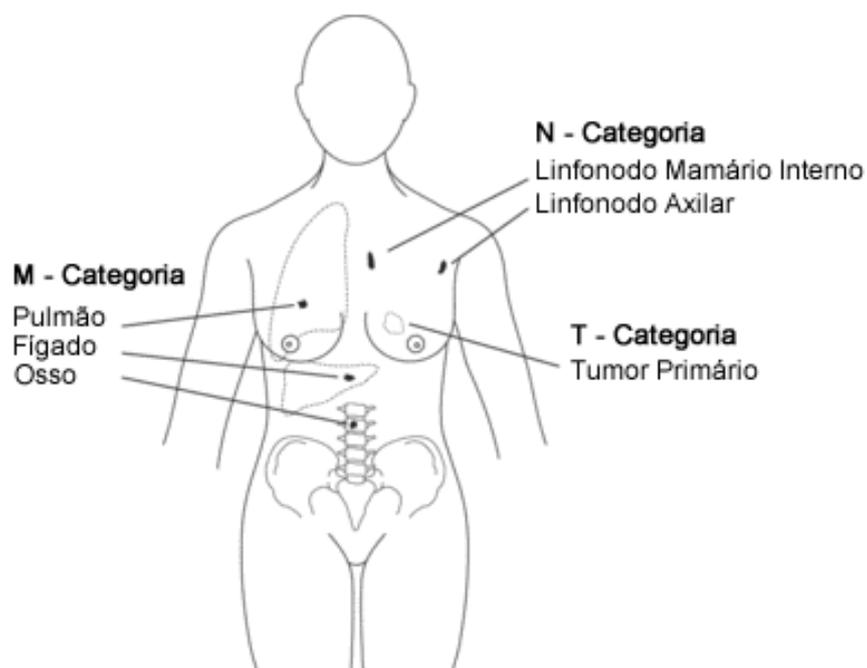


FIGURA 05 – CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS – TNM. Extensão do tumor primário (T), metástase em linfonodos regionais (N), metástase à distância (M). FONTE: modificado de UICC (2010), disponível em: http://www.internationalcancerfoundation.com/index.php?option=com_content&task=view&id=14296&Itemid=428

T TUMOR PRIMÁRIO	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Tis (CDIS) Carcinoma Ductal <i>in situ</i> ; Tis (CLIS) Carcinoma Lobular <i>in situ</i> ; Tis (Paget) Doença de Paget não associada a Carcinoma Invasivo e/ou <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão T1mi - microinvasão* de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão T1a - tumor com mais de 0,1 cm e até 0,5 cm em sua maior dimensão T1b - tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão T1c - tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 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 T4a - extensão à parede torácica

	T4b - ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites, ou edema (incluindo peau d'orange) T4c - T4a e T4b associados T4d - carcinoma inflamatório
N	LINFONODOS REGIONAIS
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por ex. foram removidos previamente)
N0	
N1	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N2	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) móvel(is), nível** I e II Metástase nos linfonodos axilares homolaterais fixos, nível I e II; ou metástase clinicamente detectadas em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es) N2a - Metástase nos linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou a outras estruturas N2b - metástase clinicamente detectadas em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)
N3	Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral
M	METÁSTASES A DISTÂNCIA
MX	A presença de metástases a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância (seguida da notação conforme a localização da metástase)

QUADRO 01 – SISTEMA TNM: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS TUMORES DE MAMA PROPOSTO POR UICC/AJCC

NOTA: *Microinvasão é a extensão de células cancerosas que atravessam a membrana basal e invadem tecidos adjacentes, em focos menores que 0,1 cm em sua maior extensão.

**Os linfonodos axilares são divididos em: nível I abaixo da borda lateral do músculo peitoral menor, nível II atrás do músculo e nível III, acima da borda medial.

FONTE: adaptado de *TNM – Classification of Malignant Tumours 7^o ed, 2010.*

O uso do sistema TNM pode gerar um grande número de diferentes subcategorias. Para simplificar a descrição, as categorias são agrupadas como fases de classificação anatômica e um dado algarismo romano é utilizado para referir o estadiamento do tumor (estadio 0, I, II, III e IV) (QUADRO 02). O Estadio 0 abrange tumores localizados apenas no órgão de origem, enquanto os Estádios I e II correspondem a tumores localmente disseminados, diferente do Estadio III, com metástases particulares em regiões de linfonodos axilares, e do IV, com metástases distantes (UICC, 2010).

ESTADIO	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIa	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIb	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIa	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estadio IIIb	T4	qualquer N	M0
	qualquer T	N3	M0
Estadio IV	qualquer T	qualquer N	M1

QUADRO 02 – ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES POSSÍVEIS DO SISTEMA TNM

NOTA: **T** – extensão do tumor primário, **N** - ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais e **M** - ausência ou presença de metástase à distância

FONTE: adaptado de *TNM – Classification of Malignant Tumours 7^o* ed, 2010.

Ocasionalmente, fatores prognósticos diferentes da extensão anatômica da doença podem ser incluídos à classificação TNM para definir o estadiamento clínico e patológico da neoplasia, além de orientar estratégias para o tratamento inicial de pacientes (UICC, 2010).

Histologicamente os carcinomas mamários são avaliados com base em parâmetros de diferenciação celular, formação do túbulo/ glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas (ELSTON & ELLIS, 1991; modificado de Scarff-Bloom-Richardson - SBR, 1957). Os tumores são, então, classificados combinando o *score* destes parâmetros, como: bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) ou pouco diferenciados (grau III). Paik *et al.*, 2005, mostraram que pacientes com tumores bem diferenciados apresentaram taxas de sobrevida de cerca de 93% em 5 anos, enquanto pacientes com tumores indiferenciados indicaram uma taxa inferior, 79%. Os piores índices de sobrevida, contudo, foram observados em

pacientes com número elevado de metástase e tumores de alto grau histológico, independente do tamanho da lesão e do envolvimento axilar.

Na década de 90, as pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama eram tratadas como doenças semelhantes, com base na classificação histopatológica que utiliza somente critérios clínicos e morfológicos (VIEIRA *et al.*, 2007). Tumores com grau histológico e estádios idênticos, no entanto, podem apresentar evoluções divergentes, com diferentes respostas terapêuticas e orientações prognósticas (CALLAGY *et al.*, 2003). No contexto descrito, tanto a classificação TNM quanto o grau histológico apresentam indicativos da sobrevida para as pacientes com câncer de mama invasivo, porém falham como ferramenta para orientação terapêutica (VERONESI *et al.*, 2006).

Inúmeros fatores prognósticos e preditivos têm sido avaliados no sentido de possibilitar melhores estratégias de abordagem terapêutica dos carcinomas invasivos. Atualmente, três marcadores moleculares são rotineiramente utilizados na prática clínica em câncer de mama: receptor de estrógeno (RE); receptor de progesterona (RP); e receptor de fator de crescimento epidermal 2 (*ERBB2*) (PAYNE *et al.*, 2008). É plausível que a presença de RE e RP seja indicativas de tumores indolentes, com menor velocidade de crescimento e probabilidade reduzida de recidiva da doença. RE e RP também apresentam valor preditivo no tratamento das pacientes, com maior resposta à terapia endócrina com tamoxifeno. A droga utilizada em terapias endócrinas é um modulador seletivo do receptor de estrogênio e inibe a ligação deste receptor ao estradiol, interrompendo uma série de mecanismos que regulam a replicação e proliferação celular (DINH *et al.*, 2007).

O gene *ERBB2* (*HER2*, *HER2/neu*, *c-erbB-2*) também é considerado fator preditivo e prognóstico do câncer de mama e está presente em 10 a 34% dos tumores mamários invasivos (ROSS *et al.*, 2009). A identificação da superexpressão de *ERBB2* ou a sua amplificação em células tumorais, detectadas através de imunohistoquímica e/ou hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), sugere maior agressividade aos tumores, com altas taxas de recorrência e maior mortalidade entre as pacientes (PAL & PEGRAM, 2007). O tratamento com o anticorpo monoclonal *trastuzumab* (Herceptin®) é um importante alvo terapêutico, com significativa resposta antitumoral. A eficiência da droga está associada à inibição direta de proteínas quinases e ao bloqueio da ação de ligantes que atuam na

formação de dímeros; o complexo dimérico, quando ativo, sinaliza para uma cascata de reações que promovem a divisão celular e, por consequência, o crescimento do tumor (BASELGA & SWAIN, 2009).

A triagem de novos marcadores prognósticos moleculares é de grande importância e deve contribuir para determinar o perfil genético dos tumores mamários, permitindo uma avaliação eficaz do risco de recorrência e progressão tumoral e auxiliando na decisão terapêutica. Neste contexto, outros marcadores vêm sendo avaliados quanto a sua importância clínica, como por exemplo, a expressão de citoqueratinas basais, marcadores de proliferação (*Ki-67*, *PCNA*) e outros receptores de fator de crescimento (*EGFR*, *VEGFR*) (VIEIRA *et al.*, 2007).

Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do câncer de mama, contudo, ainda é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas. Com o advento das técnicas moleculares em larga escala foi possível definir uma correlação mais detalhada dos tumores em nível genômico. Os microarranjos de DNA, como método, permitiram a avaliação de múltiplas variáveis simultaneamente e uma melhor classificação das neoplasias mamárias, com o auxílio de recursos de bioinformática (RAKHA *et al.*, 2008).

Os primeiros trabalhos relacionados ao perfil da expressão gênica e diversidade fenotípica no câncer de mama, descrito por *Perou et al.* (2000) e posteriormente validado por *Sorlie et al.* (2001 e 2003), subdividiram os tumores de mama em cinco grupos principais: luminal A, luminal B, HER2, basal e “*normal like*”. O subtipo luminal A, receptor de estrogênio e progesterona positivos, está associado ao melhor prognóstico e maior sobrevida das pacientes. O luminal B também apresenta positividade para o RE, no entanto, não apresenta um padrão para outros marcadores. O tipo HER2 apresenta superexpressão e/ou amplificação de *ERBB2* e responde a drogas que bloqueiam a atividade deste gene. O basal, expressa diversos genes e não possui alvo terapêutico definido, portanto, não evolui bem com quimioterápicos usuais. O último grupo, “*normal like*”, não apresenta distinção clara nem valor clínico definido (SORLIE *et al.*, 2003)

Alguns obstáculos ainda dificultam a definição do diagnóstico na maioria dos casos. Vias relacionadas com o processo tumoral e a biologia do câncer, por exemplo, não são completamente compreendidas. Há heterogeneidade dos genes alvos entre as pacientes com tipos similares de tumores, com efeitos clínicos

variáveis e imprevisíveis, que justificam a inutilidade de modelos pré-clínicos que não podem prever o procedimento ideal a ser seguido. Agentes farmacêuticos também acometem, freqüentemente, células normais além das neoplásicas e a eficiência do tratamento pode estar limitada a outros fatores, como a resistência intrínseca (OSBORNE *et al.*, 2004).

2.5 Linfonodo como valor preditivo

O tratamento cirúrgico clássico do câncer de mama foi primeiramente descrito por *Halsted* no final do século XIX (HALSTED, 1894), com a introdução de procedimentos que reduziram a alta mortalidade pelo câncer de mama: a mastectomia radical, com retirada de toda a glândula mamária, da pele sobrejacente, dos músculos grande e pequeno peitoral, seguida do esvaziamento axilar (EA). Apesar da alta morbidade do tratamento radical, somente na segunda metade do século XX os procedimentos cirúrgicos utilizados no tratamento do câncer de mama apresentaram modificações expressivas, tornando-se progressivamente menos agressivos e menos invasivos. Na década de 60, as mastectomias radicais foram modificadas por *Patey*, com preservação do músculo peitoral maior; e *Madden*, mantendo os músculos maior e menor (HANDLEY, 1963; MADDEN, 1965); seguidas de cirurgias conservadoras da mama (quadrantectomia, setorectomia) associadas à radioterapia, na década de 70 (FLETCHER, 1976).

A linfadenectomia axilar foi considerada, durante décadas, não só como elemento prognóstico, mas também como importante recurso terapêutico, pela baixa incidência de recidivas axilares após este procedimento (1 a 3%) (QUADROS & GEBRIM, 2007). A difusão do rastreamento mamográfico, entretanto, possibilitou o diagnóstico de tumores de menor diâmetro e, assim, com menor probabilidade de comprometimento axilar, o que gerou questionamento quanto à necessidade de linfadenectomia axilar (ZHANG *et al.*, 2008).

No último século, grandes avanços surgiram na forma de tratar o câncer de mama (CAVALLI, 2009). A remoção radical da glândula e das estruturas adjacentes foi substituída por cirurgias conservadoras, tornando fundamental a abordagem

clínica de linfonodos axilares (LA). Os linfonodos estão associados a ductos linfáticos que drenam vários tecidos e atuam como pontos de coleta para fragmentos subcelulares e células que deixam seu local de origem. Isso explica porque os gânglios são rotineiramente examinados para determinar a presença de células tumorais, como advertência inicial da presença de metástase (WEINBERG, 2008).

Os LAs estão divididos basicamente em três níveis cirúrgicos em sua disposição anatômica, como referência o músculo peitoral menor, de acordo com *American Joint Committee on Cancer* (AJCC): nível I corresponde a linfonodos axilares peitorais (anteriores), subcapsulares (posteriores) e umerais (laterais); nível II se refere à centrais, interpeitorais (*Rotter*) e alguns apicais; o nível III, linfonodos axilares apicais (FIGURAS 06 e 07).

As metástases para os linfonodos não são aleatórias. O linfonodo sentinela (LS) é considerado o primeiro a receber a drenagem linfática da área tumoral, decorrente da progressão ordenada de células pelo sistema linfático (QUADROS & GEBRIM, 2007). A biópsia do LS vem se constituindo num método eficaz de amostragem axilar seletiva, minimamente invasiva e altamente sensível para a identificação de metástase loco-regional, conferindo um alto poder preditivo no estadiamento do câncer de mama (CAVALLI, 2009). Cerca de 35 a 67% das metástases da cadeia linfática permanecem nos LS (ZHANG *et al.*, 2008).

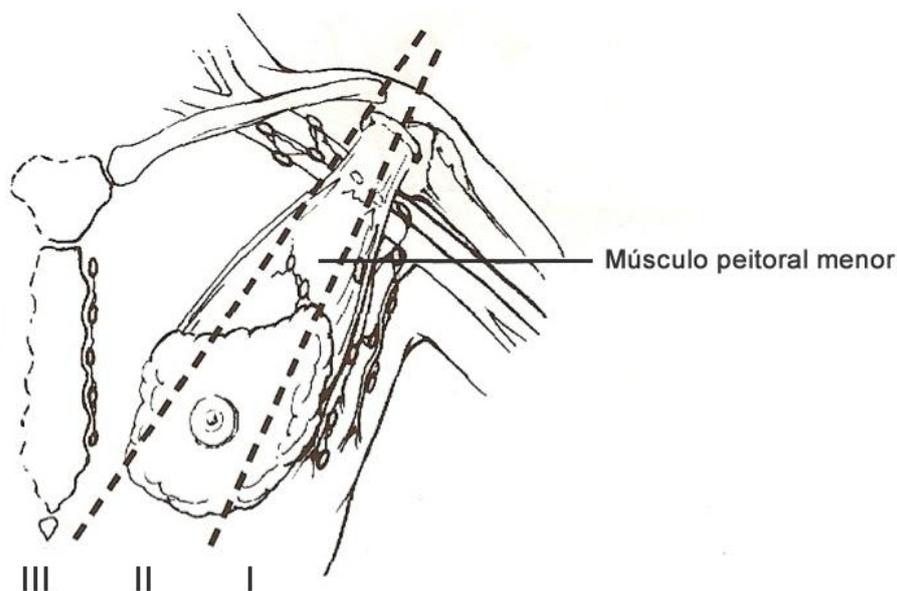


FIGURA 06 – NÍVEIS DE LINFONODOS AXILARES: I, II E III.

FONTE: modificado de UICC (2010), disponível em: <http://uwlclinicaloncology2010.wikispaces.com/Breast+%28T3-T4%29>

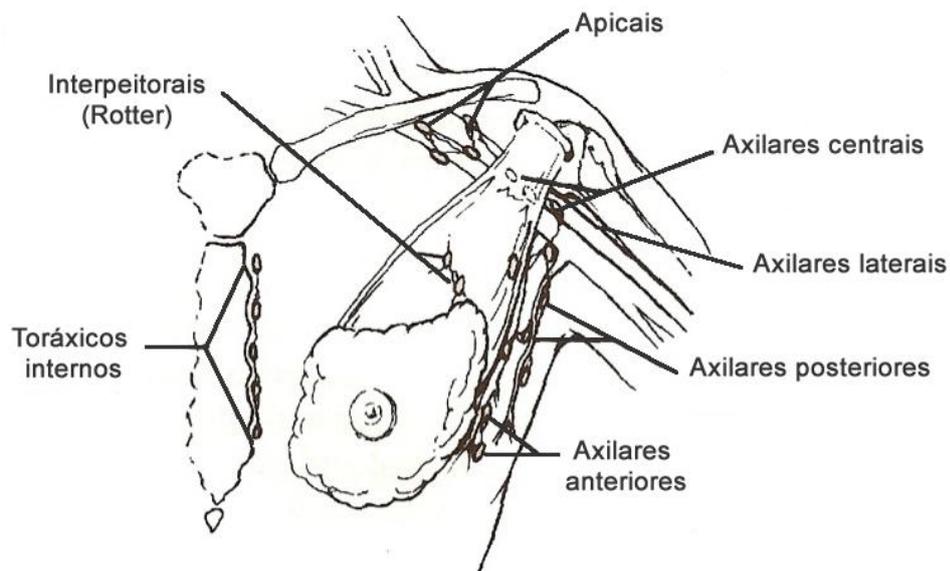


FIGURA 07 – REDE LINFÁTICA DISTRIBUÍDA NA SUPERFÍCIE DO TÓRAX, PESCOÇO E ABDÔMEN. Entre os linfonodos assinalados estão interpeitorais, apicais, axilares centrais, axilares laterais, axilares posteriores, axilares anteriores e torácicos internos.

FONTE: modificado de UICC (2010), disponível em: <http://uwclinicaloncology2010.wikispaces.com/Breast+%28T3-T4%29>

O método de exame per-operatório do LS é variável, sendo o ‘imprint’ citológico o mais utilizado, com sensibilidade de 84,6%, especificidade de 96,6% e acurácia de 94,1% para o diagnóstico de metástases em pacientes com câncer de mama. O exame per-operatório do LS permite ao mastologista definir pela necessidade ou não da realização do EA durante o ato cirúrgico. Este procedimento possibilita a visualização das bordas de corte macroscópico do LS na representação citológica, facilitando a localização de áreas suspeitas de macrometástases. No caso de ‘imprint’ positivo, com indicação imediata de EA, o LS é enviado para exame histopatológico de confirmação juntamente com os LAs removidos. ‘Imprint’ negativo deve ser ratificado também por diagnóstico histopatológico em parafina e, caso seja encontrada metástase, indica-se o EA em nova cirurgia (MOTOMURA *et al.*, 2008).

Na prática, o exame histopatológico dos LAs removidos mostram ausência de metástases em parte significativa dos pacientes com câncer de mama, especialmente quando a neoplasia encontra-se no estágio inicial. Entre as conseqüências mais comuns relacionadas à dissecação dos LA estão: redução da mobilidade do braço, infecção local, leve a intensa dor na região, seroma e linfedema, com sensível comprometimento da qualidade de vida das pacientes.

Como procedimento padrão para o estadiamento do câncer de mama, mais da metade das pacientes submetidas à linfadenectomia total apresentam linfonodos livres de metástases, e são, portanto, expostas a complicações e riscos cirúrgicos desnecessários (TIEZZI *et al.*, 2006).

Em carcinomas com até 1 cm de diâmetro a probabilidade de envolvimento axilar é de aproximadamente 10 a 15% (MORA *et al.*, 2009). Estudos indicam que as taxas de recidiva observadas em pacientes com LS negativos variam de 0,5 a 1,4%, demonstrando que a biópsia deste linfonodo é um procedimento que apresenta baixa taxa de recorrência clínica, a qual pode substituir de maneira segura, de acordo com critérios pré-estabelecidos, a dissecação de LA quando a biópsia do LS for negativa (TAKEI *et al.*, 2007). É extremamente relevante para o paciente e para o cirurgião o estabelecimento de uma técnica pré-operatória que selecione de modo adequado os indivíduos com metástases em linfonodos axilares, que diretamente seguem para o esvaziamento axilar.

A existência de nódulos axilares palpáveis é freqüentemente usada para decidir se será realizada uma biópsia do linfonodo sentinela ou um esvaziamento axilar. A palpação axilar, entretanto, mostra baixa sensibilidade e especificidade (VAN ZEE *et al.*, 2003). Linfonodos podem apresentar características benignas ou malignas. Os primeiros apresentam forma alongada ou ovóide, com córtex fino e habitualmente homogêneo, formado por tecido ganglionar propriamente dito e o hilo central, formado por tecido adiposo, conjuntivo e vascular. Já o linfonodo com características de malignidade apresenta forma arredondada e irregular, com espessamento do córtex e diminuição ou ausência do hilo. Devido à angiogênese tumoral há um aumento dos vasos corticais que passam a ser visíveis na ultrasonografia. O tamanho do linfonodo, no entanto, não é um indicador de benignidade ou malignidade, existindo linfonodos normais maiores que 5cm e linfonodos menores que 5mm que apresentam metástases (MORA *et al.*, 2009).

O ultra-som, pouco utilizado para o estadiamento dos linfonodos axilares, é um importante método diagnóstico, com vantagens sobre a tomografia e a ressonância, e com possibilidade de biópsias guiadas. Este método avaliado em vários estudos para verificar o estado dos LAs mostrou uma sensibilidade de 36 a 73%, especificidade de 70 a 100%, taxa de falsos negativos entre 9 e 51% e falsos

positivos de 4 a 35%. Assim, a avaliação ultra-sonográfica da região axilar não deve ser utilizada como um método isolado para orientação clínica (MORA *et al.*, 2009).

Metástases não diagnosticadas pelo exame histopatológico de rotina são denominadas ocultas. Duas variáveis principais desta forma de metástases são descritas: presença de células tumorais isoladas e micrometástases. As primeiras se constituem em células neoplásicas dispersas ou formando agrupamentos com até 0,2 mm de extensão e as micrometástases são definidas como agregados celulares com extensão entre 0,2 e 2 mm (QUADROS & GEBRIM, 2007). Embora as reais implicações decorrentes da presença de micrometástase e, sobretudo, de células tumorais isoladas nos LS sejam controversas, é necessário valorizar a importância de estudos anatomopatológicos mais precisos a fim de garantir taxas mínimas de falsos-negativos. Uma terceira, a chamada 'skip' metástase, é incomum e ocorre em cerca de 1,6% das vezes. Neste caso, a metástase não segue um padrão regular de distribuição, ou seja, poderia haver comprometimento de LAs de níveis mais altos (níveis II ou III), mesmo estando o nível I sem comprometimento (TAN *et al.*, 2008).

Diversos estudos foram realizados objetivando o aprimoramento na identificação de metástases em linfonodos axilares e sentinela, e a validação de técnicas para o diagnóstico em câncer de mama, sendo o sucesso da análise dependente da metodologia utilizada e de características individuais das pacientes. Alguns autores evidenciam, ainda, a presença significativa de DNA alterado em lesões metastáticas de LS que podem contribuir como valor preditivo em biópsias de linfonodos (SANTOS *et al.*, 2008). As metodologias referentes ao processamento dos LS e axilares, com a finalidade de detectar metástases ocultas, contudo, precisam estabelecer princípios que apresentem resultados precisos no diagnóstico de alterações. Além de orientar o tratamento cirúrgico, o estadiamento axilar é determinante na indicação de tratamento quimioterápico (PIATO *et al.*, 2008).

2.6 Tumor primário de mama e respectivos linfonodos axilares

Uma das principais necessidades na pesquisa moderna do câncer de mama é compreender os mecanismos moleculares que conduzem as células tumorais à

metástases, incluindo como e quando ocorre a ativação de novas capacidades. A análise de amostras pareadas de tumores de mama primários e linfonodos da mesma paciente têm possibilitado a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de metástase, fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativa de um comportamento clínico particular de cada neoplasia (SUZUKI & TARIN, 2007; VECCHI, *et al.*, 2008).

Alguns estudos originais comparando tumores primários de mama e metástases, utilizando tecnologias genômicas e proteômicas foram publicados (WEIGELT *et al.*, 2003; HAO *et al.*, 2004; LAHDESMAKI *et al.*, 2004; FENG *et al.*, 2006; NAKAGAWA *et al.*, 2006; SUZUKI & TARIN, 2007; VECCHI, *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008). Os trabalhos utilizaram diferentes metodologias, principalmente CGH (*Hibridização Genômica Comparativa*), imunohistoquímica, arranjos de DNA complementar (cDNA) e técnicas proteômicas. Os resultados fornecem a identidade de genes e proteínas diferencialmente expressos em ambas as amostras e apoiam fortemente a conclusão de que a aquisição de competências metastáticas ocorre progressivamente ao longo do tempo e, muito raramente, é evento precoce na progressão neoplásica. Outros, refutam a afirmação sobre progressão em eventos contínuos e sugerem que uma conversão inicial na célula é a regra primária, podendo direcionar conclusões importantes sobre o surgimento do fenótipo metastático das neoplasias humanas (BERNARDS & WEINBERG, 2002).

A pesquisa envolvendo linfonodos é de grande importância para o reconhecimento e compreensão dos mecanismos iniciais relacionados ao processo de metastatização. *Isola et al.* (1995) foram os primeiros a relatar que alterações genéticas detectadas por CGH podem contribuir na avaliação do prognóstico, com base em diferenças no número de cópias do DNA entre pacientes linfonodo positivo e negativo. *Nishizaki et al.* (1997), também utilizando CGH, compararam tumores primários de mama e suas metástases linfonodais. No estudo, foram observadas alterações cromossômicas em maior número nos linfonodos quando comparadas com os tumores primários, com frequência superior de regiões amplificadas. Os autores ainda descreveram que as alterações mais comuns observadas em ambos os grupos foram ganhos em 1q, 8q e 17q, e perdas em Xp, 6q, 8p, 9q, 13q, 16q e 17p. Outras alterações posteriormente detectadas foram ganhos nos cromossomos

19, 16, 1pter~p32, 20, 17 e perdas em 13q13~q32, 6q13~q23. Ganhos de 1q e 17q e perdas de 6q e 13q também foram descritas como anomalias freqüentes em tumor primário de mama, em comparação com sitios metastáticos (SANTOS *et al.*, 2008).

Li et al. (2008), usando array-CGH, descreveram alterações genéticas freqüentes em ambos, tumores primários e metástases no linfonodo axilar. Ganhos incluindo 1q23.3-44 (44%) e 8q11.22-24.3 (52%), e perdas em 16q21-23.2 (42%), 17p13.3-11.2 (54%) e 22q11.23-13.33 (53%), corroboram estudos publicados anteriormente. A instabilidade do genoma é uma característica importante do câncer e desempenha um papel fundamental na carcinogênese humana. Em consonância, as regiões de aberrações recorrentes identificadas neste estudo estão associadas a alguns proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Oncogenes *MMP16*, *MYC* e *PTK2*, por exemplo, estão localizados em 8q11.22-24.3, genes supressores de tumor *TP53* e *NF1* são abrigados em 17p13.3-11.2, e *CHEK2* e *NF2* estão localizados em 22q11.23-13.33. Estas regiões são suscetíveis a alterações que dirigem a progressão tumoral, enquanto outras áreas menos freqüentes em aberrações variam devido à instabilidade do genoma.

Vários grupos analisaram os perfis de expressão gênica de carcinomas primários da mama e suas metástases linfonodais utilizando microarranjos de DNA. De modo geral, poucas diferenças significativas foram observadas entre os dois grupos amostrais quando o número total de alterações cromossômicas foi comparado; o mesmo acontecendo quanto à complexidade cariotípica. A ausência de diferenças significativas contudo não define grande semelhança entre as amostras (SUZUKI & TARIN, 2007; LI *et al.*, 2008).

Maiores detalhes foram revelados em análises de expressão gênica comparando tumores primários e linfonodos axilares. *Suzuki & Tarin* (2007) encontraram 27 genes diferencialmente expressos nos pacientes avaliados, consistentes com as análises estatísticas. Em sua maioria, são genes que codificam para metaloproteinases, colágenos e osteonectina/espartina, também apontados em outros estudos como associados ao evento metastático. Genes de metaloproteinases e colágenos, são superexpressos no tumor primário, o que implica na maior atuação destes em fases iniciais da carcinogênese.

De modo geral, os genes superexpressos em tumores primários estão envolvidos na degradação da matriz extracelular, potencial metastático e capacidade

de disseminação, diferente de sítios de metástases onde os genes com expressão aumentada atuam na transcrição, transdução de sinal e resposta imune, proporcionando vantagens proliferativas e de sobrevivência celular. Os genes *NTS* e *PAX5* foram encontrados superexpressos em linfonodos metastáticos, enquanto *COL11A1*, *KRT14*, *MMP13*, *TAC1* e *WNT2* apresentaram aumento de expressão em tumores primários de mama. Diferenças de expressão observadas em 51 genes no total sugerem o envolvimento de um conjunto gênico atuando para o sucesso da invasão e colonização de células tumorais em linfonodos (ELLSWORTH *et al.*, 2009).

Vecchi *et al.* (2008) sugerem que componentes do estroma atuam em conjunto com o tumor no processo de metástase. A perda de expressão de *SFRP2*, *POSTN* e *FN1* em metástases podem ocorrer devido a mudanças em componentes epiteliais, que diferem no ambiente peritumoral inicial e metastático. Alguns genes, como *SERPINB5*, *MMP7*, *APOD* e *LTF*, apresentam associação com tumores, quando pouco expressos, e estão relacionados com prognóstico desfavorável e habilidade metastática no câncer de mama. Divergências na expressão de *CXCR4* e *MMP9* também podem estar implicadas no processo de invasão.

Utilizando metodologias proteômicas foram avaliadas proteínas diferenciais em tumores primários e metástases em linfonodos axilares. Os resultados mostraram uma alta similaridade entre os perfis de expressão global de proteínas dos tumores primários e linfonodos metastáticos de um mesmo paciente. Apesar das semelhanças observadas entre os perfis de expressão, foram detectadas apenas mudanças significativas no nível quantitativo das proteínas individuais em vários pares analisados. Uma possível explicação para esta observação, no entanto, envolve as modificações nas células do tumor primário como resultado da transição epitelial-mesenquimal (EMT) (LI *et al.*, 2008).

Nakagawa *et al.* (2006) observaram ainda a expressão diferenciada de timosina β -10, uma proteína de união a actina, altamente conservada, envolvida no crescimento e diferenciação dos vários tipos de células, com papel sugestivo na invasão e metástase. Timosina β 10 é altamente expressa em tecidos fetais e pouco em tecidos adultos normais. A superexpressão desta proteína também é encontrada em muitos tumores, incluindo câncer de mama. A superexpressão de ubiquitina, por outro lado, estaria associada ao bom prognóstico no câncer de mama, observada

em pacientes com linfonodos negativos. Trabalhos mais substanciais, contudo, são necessários para indentificar moléculas como potenciais marcadores de origem e progressão tumoral.

As semelhanças observadas entre os tumores primários e secundários fornecem evidências convincentes de que os processos biológicos fundamentais que moldam o aparecimento do fenótipo metastático apresentam homologias subjacentes. A identidade exata de genes e proteínas expressos que caracterizam a invasão ainda não é totalmente clara, embora o uso de metodologias diferenciadas possibilite a compreensão da atuação do conjunto genômico e proteômico. É importante reconhecer, todavia, que os tumores não são isolados de células malignas, mas conjuntos complexos de diferentes tecidos, que incluem componentes expressos das populações de células do hospedeiro atuando em resposta ao tumor (SUZUKI & TARIN, 2007).

Fatores que podem contribuir em graus variáveis para estas discrepâncias entre os diferentes estudos incluem: (a) a variabilidade genética interindividual humana; (b) diferentes delineamentos dos estudos, por exemplo, assinaturas de expressão de genes relacionados ao prognóstico, ou à sobrevivência ou à presença de metástases; (c) os diferentes tipos de métodos para analisar grandes conjuntos de dados; (d) o fracasso da maioria dos estudos para validar os resultados com métodos quantitativos diferenciais; (e) falta de procedimentos para controle de qualidade de amostras de tecidos, especialmente o conteúdo da célula tumoral; e (f) o número relativamente pequeno de amostras utilizadas em investigações proteômicas, em relação ao maior número para estudos de genes (SUZUKI & TARIN, 2007).

2.7 Genômica funcional: proteômica

Um grande empreendimento científico-tecnológico com o intuito de seqüenciar e mapear o conjunto de genes humanos foi idealizado e iniciado na década de 90. Com o Projeto Genoma Humano, um grande número de informações obtidas puderam sugerir modos de expressão gênica, mas não fornecer dados sobre

eventuais modificações pós-traducionais ou possíveis alterações no controle da atividade celular em resposta a condições ambientais particulares (BANKS *et al.*, 2000). Na mesma época, parte das metas e expectativas relacionadas à genômica estrutural foram também direcionadas à genômica funcional, como análises de transcritos de mRNA (RNA mensageiro), proteínas, suas atividades e interações, em ciências “ômicas” denominadas, respectivamente, transcriptômica, proteômica, metabolômica e interactômica, dentre outros estudos (YADAV, 2007).

O termo ‘proteoma’ foi inicialmente proposto por *Wilkins*, em 1995, e refere-se ao conjunto de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou uma célula. O surgimento da proteômica está diretamente relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e o impacto dos produtos protéicos no metabolismo de células, tecidos ou órgãos (WILKINS *et al.*, 1996).

Oposto ao genoma, um repositório essencialmente estático da informação genética, o proteoma é altamente dinâmico e capaz de refletir o ambiente no qual determinada célula ou organismo se insere. Um mesmo tipo de célula, portanto, pode apresentar diferentes proteomas em resposta à ação de drogas, infecção por patógenos, poluição e estresse abiótico em geral, os quais influenciam diretamente a bioquímica e a fisiologia da célula (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Normalmente, uma célula possui apenas parte do total de genes do genoma apta a formar proteínas, ou seja, expressa somente um subconjunto de seus genes. A regulação da expressão gênica, desde a transcrição do mRNA até modificações pós-traducionais, estão diretamente associadas a ampla variedade de tamanho, forma e complexidade dos produtos (GRAVES & HAYSTEAD, 2002). As modificações químicas na cadeia protéica conhecidas incluem: forforilação, acetilação, alquilação, metilação, sulfatação, isoprenilação, glicilação, sumoilação, ubiquitilação e formação de pontes dissulfeto. Algumas dessas modificações estendem o conjunto de possíveis funções protéicas pela adição de novos grupos funcionais ou de cadeias de carboidratos e/ou lipídeos. Modificações, como a fosforilação, são parte de um sistema para controlar o comportamento protéico, ativando ou inativando proteínas, amplamente utilizado pela célula (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

Em termos biológicos, contudo, uma proteína é muito mais do que a cadeia linear de aminoácidos que a constitui. O modo como essa cadeia se dobra e redobra para produzir as configurações tridimensionais características é, na verdade, a chave da sua função. A forma estrutural mais estável pode variar de acordo com as condições do meio. O enovelamento, em seu processo, é dirigido por forças de *Van der Waals*, com contribuições da energia livre de *Gibbs*, interações eletrostáticas formação de ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto (KASTRITIS & BONVIN, 2010).

Os direcionamentos da proteômica podem subdividir categorias de trabalho para a compreensão do conjunto protéico em cada uma de suas partes. A primeira delas envolve a pesquisa de proteínas em sua seqüência peptídica, estrutura e função; entre as aplicações da proteômica, a mais desafiadora. O perfil de expressão protéica, o segundo grupo, não menos importante, é realizado através de análises diferenciais, por exemplo, comparando proteínas expressas em diferentes condições ou diferentes tecidos/organismos. O mapeamento da rede de proteínas, também é essencial como base para outras pesquisas. Por fim, a caracterização das modificações pós-traducionais, uma área altamente especializada que visa à determinação da condição e da forma na qual as proteínas interagem umas com outras nos seus ambientes naturais e de que modo essas proteínas são modificadas (SOMIARI *et al.*, 2005).

Uma vantagem particular do proteoma é que não apenas tecidos, mas também fluidos corporais como plasma, urina e saliva, podem ser utilizados para investigar a correlação molecular de doenças e a ação de drogas. O campo de atuação desta ciência torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, de moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil para o diagnóstico precoce de doenças, acompanhamento da sua evolução e no tratamento direcionado. Como ferramenta essencial para construção de candidatos de alta especificidade e relevância clínica, a proteômica pode fornecer a prova concreta de que algumas proteínas não são apenas o resultado de uma resposta adaptativa do organismo (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

As aplicações futuras das tecnologias proteômicas devem aproximar a ciência experimental e a medicina aplicada em descobertas relevantes para o câncer de

mama, além de fornecer subsídios para o entendimento de mecanismos moleculares implícitos, como a proliferação celular desordenada e o processo metastático (COWAN & VERA, 2008). Os objetivos são duplos: entender os mecanismos básicos de iniciação e progressão do câncer e identificar novos potenciais alvos biomarcadores. O câncer de mama, entretanto, constitui uma doença multifatorial tão diversa que deve exigir, nos próximos anos, tempo e grandes esforços para definir os seus modelos proteômicos e traduzi-los em aplicações práticas para a clínica (HONDERMARCK, 2003).

Embora o conceito de Proteoma seja relativamente novo, este termo engloba uma série de técnicas e metodologias complementares para a pesquisa. O emprego de métodos de separação e identificação, como eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, respectivamente, possibilitou a detecção de proteínas de modo diferencial (LATTERICH *et al.*, 2008). O aperfeiçoamento destas técnicas também permitiu o avanço no estudo de proteínas em larga escala. Recentemente, o desenvolvimento de métodos alternativos para separação e identificação de proteínas como tecnologias baseadas em chips, nos chamados microarranjos de proteínas, tecnologias de identificação protéica multidimensional (MudPIT - *Multidimensional Protein Identification Technology*) e o uso de *tags* de afinidade (ICAT - *Isotope Coded Affinity Tags*), marcam o início de uma nova era (SOMIARI *et al.*, 2005).

Um aspecto relevante para o atual sucesso da proteômica envolve tecnologias de bioinformática, com o desenvolvimento de programas computacionais capazes de analisar, armazenar e correlacionar grande quantidade de dados, além de disponibilizar informações através de ferramentas úteis para estudos mais aprofundados (BISCH, 2004). A *Human Proteome Organization* (HUPO), como organização científica internacional que representa e promove a proteômica, elaborou um sistema de análise integrada que avalia novas tecnologias desenvolvidas na área e a criação de um banco de dados, como iniciativa para inserir identificações de proteínas e peptídeos (PITTERI & HANASH, 2007). Outro ponto para o sucesso se deve à possibilidade de correlacionar dados obtidos em técnicas proteômicas a dados genômicos, de forma integrada, que podem futuramente auxiliar na individualização e otimização do tratamento de pacientes (CHUNG *et al.*, 2007).

2.8 Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração de moléculas carregadas em função da aplicação de um campo elétrico. A velocidade de migração de uma proteína depende da intensidade de campo, da carga líquida da proteína e do seu coeficiente de atrito (ROCHA *et al.*, 2005). Os primeiros estudos proteômicos, no entanto, utilizaram um modelo mais elaborado da técnica; a eletroforese bidimensional (2D PAGE). Os fundamentos desta abordagem foram inicialmente propostos em 1975 por *O'Farrell* e *Klose*, que introduziram a metodologia para a separação de proteínas usando 2D PAGE em gel de poliacrilamida (GÖRG, 2007).

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são submetidas a duas separações eletroforéticas consecutivas. A primeira etapa, denominada primeira dimensão, consiste em uma isoeletrofocalização (IEF) que permite a separação das proteínas pela sua carga elétrica em um gel de poliacrilamida, com gradiente imobilizado. Esse gradiente é estabelecido através do acoplamento químico entre poliacrilamida e moléculas orgânicas anfóteras (ácidos e bases) de baixa massa molecular, sob ação de um campo elétrico. Quando a mistura proteica a ser analisada é aplicada sobre o gel imobilizado, as proteínas migram em direção à sua carga até atingir uma posição neutra, denominada repouso. A posição estacionária, onde a carga líquida é zero, corresponde ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, ou o seu potencial hidrogeniônico (pH) (GÖRG, 2007).

Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com as respectivas massas moleculares (MM). A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) apresenta uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de bis-acrilamida (N,N'-Metileno-bis-acrilamida), cuja porosidade depende da concentração destes reagentes no gel. Ao final do processo, é obtido um mapa bidimensional da amostra, onde as proteínas são separadas por dois parâmetros físico-químicos; pI na horizontal, e MM aparente na vertical. As proteínas são visualizadas no gel através de métodos de coloração com azul de *Comassie*, prata, compostos fluorescentes, autoradiografia ou detecção com imunoquímicos, contendo múltiplas cópias de uma proteína em cada banda ou

spot (GÖRG *et al.*, 2004). 2D-PAGE é uma técnica eficiente que pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos, com milhares de proteínas visualizadas simultaneamente (CARRETTE *et al.*, 2006).

Durante a década de 90, a Espectrometria de Massas (MS) surgiu como uma técnica analítica sensível capaz de avaliar fragmentos peptídicos em segundos. O desenvolvimento da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) causou uma revolução na extensão das aplicações de espectrometria de massas. A metodologia permitiu avanços técnicos e conceituais em outras áreas além da proteômica e, em 2002, premiou o químico *John B. Fenn* e o engenheiro *Koichi Tanaka*, seus criadores, com o Nobel de Química (ZHOU & VEENSTRA, 2008).

Na análise por MALDI, a amostra é embebida em uma matriz química que facilita a produção de íons intactos em fase gasosa a partir de compostos pesados, não-voláteis e termicamente lábeis como proteínas, oligonucleotídeos, polímeros sintéticos e compostos orgânicos. Um feixe de laser pulsado serve como fonte de dessorção e ionização. A matriz absorve a energia do laser, induzindo a vaporização de parte da amostra, transferida eletrostaticamente para o espectrômetro de massas, onde são individualmente detectadas, geralmente por analisador do tipo ToF (*Time of flight*). Entretanto, outros tipos de analisadores podem ser utilizados em conjunto com MALDI (PREISLER *et al.*, 1998).

O analisador de massas é fundamental em proteômica/MS, e seus parâmetros chave são a alta sensibilidade, resolução, precisão e exatidão na medida de massa e a capacidade para gerar fragmentos peptídicos (espectros de MS/MS). Existem quatro tipos básicos de analisadores de massas atualmente utilizados em pesquisas proteômicas: ion-trap, ToF, quadrupolo e analisadores de ressonância ciclôtrica de íons transformado de Fourier (FTMS). Estes espectrômetros diferem em *design* e desempenho. Estes analisadores podem ser utilizados isoladamente ou em sistemas híbridos em seqüência para explorar as prerrogativas individuais (MEDZIHRAJSZKY *et al.*, 2000).

O mecanismo do MALDI-ToF é complexo e envolve a interação de processos físicos e químicos (FIGURA 08). O pulso do laser geralmente tem duração de nano segundos. A taxa e a profundidade do aquecimento proporcionado pelo laser

causam a formação de gás, resultando em explosão de fase, ou seja, na ejeção de gás e fragmentos da amostra, os quais podem ou não vaporizar, dependendo da quantidade de energia. Os íons formados passam por diferentes estágios de aceleração e por sistemas ópticos até atingir um detector do tipo MSP (*Micro Spheres Plates*). A análise dos íons moleculares é feita através da razão massa/carga reproduzida em gráfico, interpretados posteriormente por programas de computador (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

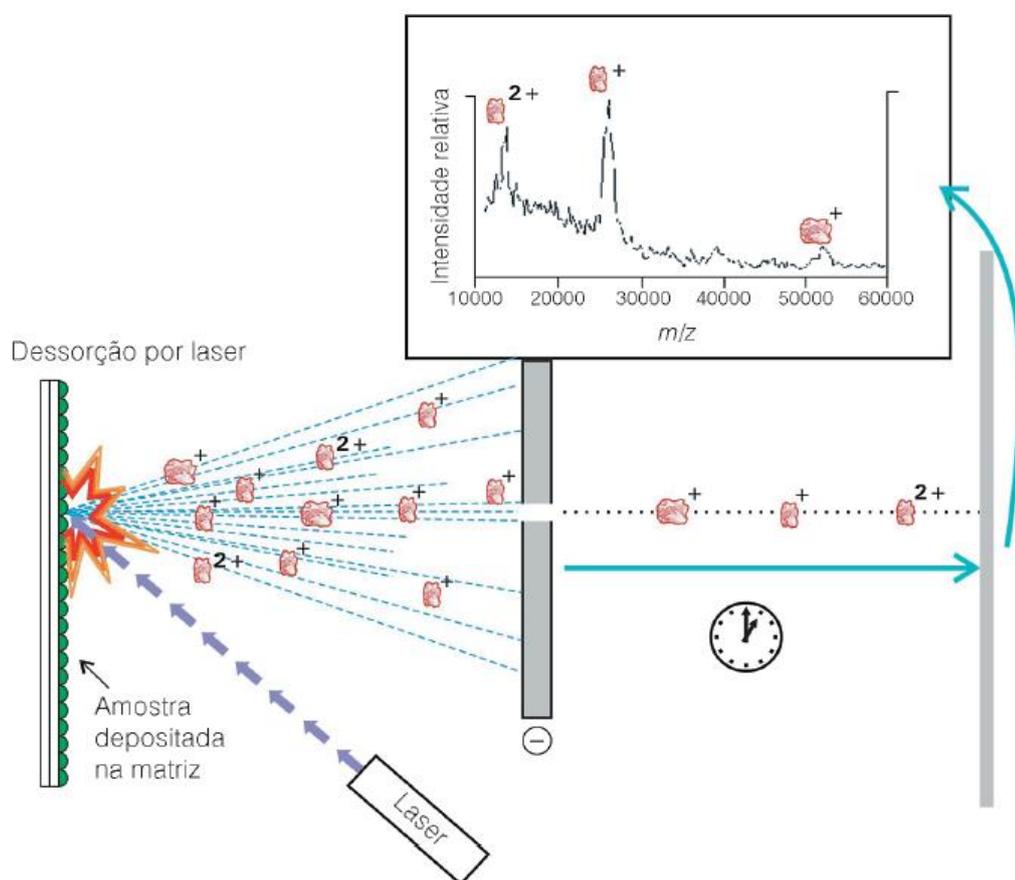


FIGURA 08 – DIAGRAMA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSA COM DESSORÇÃO/ IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO. Na figura, há incisão do laser e ionização da amostra que segue o sistema de aceleração por campo elétrico (placa negativa). A dispersão dos íons em função da razão m/z (em diferentes tempos de vôo, indicados pelo cronômetro) é interpretada pelo detector como dados gerados no gráfico superior.
FONTE: COLNAGO *et al.*, 2002.

O conjunto das massas relativas dos peptídeos determinado por esta técnica corresponde ao chamado *Peptide Mass Fingerprint* (PMF), como o nome indica, a impressão digital da proteína, usada para a sua identificação. Em muitos casos, seqüências específicas de clivagem da proteína juntamente com a análise da relação massa-carga fornecem dados suficientes para a identificação de peptídeos da amostra. A enzima mais utilizada neste tipo de análise é a tripsina, que faz clivagem específica em C-terminal, adjacente a resíduos de lisina e arginina (se estes não forem precedidos por prolina) (KUMARATHASAN *et al.*, 2005).

As vantagens das técnicas de MS incluem sensibilidade, rapidez e aplicação a misturas complexas. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, a MS tem sido destacada não apenas para estudos de estruturas primárias de proteínas, mas também como a tecnologia central no campo de proteômica. As análises proteômicas são hoje uma ferramenta valiosa na determinação da presença de biomarcadores ou no mapeamento do perfil protéico dentro de grupos de amostras diferentes. A determinação da variação na concentração relativa e absoluta de peptídeos é fundamental para a descoberta de marcadores eficientes (WILKINS *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea, sendo o segundo tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo. Embora as neoplasias mamárias venham sendo extensivamente estudadas durante as últimas décadas, os mecanismos moleculares envolvidos na sua etiologia não são plenamente compreendidos. A análise de amostras pareadas de tumor primário de mama e metástases axilares correspondentes tem possibilitado a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de metástase.

Neste contexto, a proteômica deve contribuir significativamente para a compreensão das entidades protéicas envolvidas na carcinogênese, além de auxiliar diretamente na busca por novos marcadores moleculares para a detecção precoce de metástases como a fim de instituir uma terapia loco-regional e sistêmica individualizada, com menor morbidade, maior controle local e que proporcione qualidade de vida para as pacientes. Melhorar a propriedade e a eficiência de biomarcadores diagnósticos e alvos terapêuticos constituem estratégias relevantes em todos os âmbitos da pesquisa.

4. OBJETIVOS

4.1 Gerais

Analisar comparativamente o perfil proteômico de amostras de tumores primários de mama e respectivo linfonodo axilar e avaliar as variações que possam ser relevantes como marcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama, contribuindo também para o entendimento das vias biológicas responsáveis pela transformação e progressão neoplásica.

4.2 Específicos

- ✓ Padronizar a metodologia de extração e quantificação de proteínas em amostras de linfonodos axilares;
- ✓ Identificar proteínas diferencialmente expressas em amostras de carcinoma primário de mama e respectivo linfonodo axilar;
- ✓ Avaliar o possível envolvimento de produtos protéicos na origem e evolução de células tumorais, linfangiogênese e metástase em linfonodos axilares;
- ✓ Identificar possíveis biomarcadores que possam contribuir na prática clínica para o diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer metastático;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Abordagem ética e experimental

Este trabalho faz parte de um estudo maior na área da Genética do Câncer de Mama, aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba / PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003. As pacientes foram convidadas a participarem da pesquisa, firmando um termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a coleta do material biológico.

5.2 Processamento do material biológico

5.2.1 Caracterização das amostras

As amostras de tumores primários e linfonodos axilares correspondentes foram obtidas de pacientes com câncer de mama, em diferentes estágios clínicos, submetidas a procedimentos cirúrgicos nos períodos de 2008 e 2009. O grupo experimental, composto por oito mulheres, apresentou média de idade de $60,25 \pm 8,63$ anos e variou de acordo com o perfil clínico obtido através de prontuários médicos.

5.2.2 Coleta do material biológico

Após procedimento cirúrgico, realizado nos hospitais Nossa Senhora das Graças e de Clínicas de Curitiba, as amostras de tumores primários e linfonodos

axilares foram selecionadas pelo patologista responsável antes de qualquer procedimento de preservação. Os fragmentos assim removidos foram acondicionados em tubos Falcon (50 mL) devidamente identificados e, em seguida, encaminhados ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LCHO) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

No fluxo laminar, o material biológico foi disposto sobre uma Placa de Petri, em temperatura ambiente, para a remoção de tecidos adjacentes, vasos sanguíneos e gordura, posteriormente descartados. As amostras foram fragmentadas com o auxílio de pinças, tesouras e bisturis estéreis e, em seguida, armazenadas a 80°C negativos em microtubos de 1,5 mL para futura extração de proteínas.

Algumas amostras de tumores primários de mama (6) foram processadas pelo Biólogo Rodrigo Kaviski, utilizadas para o desenvolvimento de sua dissertação de mestrado intitulada 'Análise Proteômica de Carcinomas Primários de Mama', defendida e aprovada neste curso em Abril de 2010.

5.2.3 Extração protéica

Para a extração das proteínas, a quantidade de material biológico utilizado variou entre 300 e 91 mg, de acordo com a disponibilidade de tecido, quando inferior ao peso de 300 mg. Às amostras, foram adicionados 1000 µL de Tampão de Lise (7M de uréia, 2M de tiouréia, 40mM de tris e 4% de CHAPS) e 2 µL de inibidor de protease (PMSF), conforme recomendado e adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). A homogeneização foi realizada com um triturador elétrico. O procedimento de extração envolve a solubilização, desnaturação e redução de proteínas que, sobre a ação dos reagentes da solução de lise, rompem as interações intra- e intermoleculares, e mantém-nas imobilizadas em solução.

A etapa seguinte constituiu-se de centrifugação da amostra a 12.000 rpm, durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, resultando em sobrenadante contendo as proteínas extraídas do material e um precipitado “impuro”, descartado.

5.3 Quantificação das proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi mensurada a partir da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) e leitura de absorbância a 595 nm. O mecanismo básico do ensaio consiste na ligação do corante (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), em pH ácido, à resíduos de arginina, histidina, fenilalanina, triptofano e tirosina (DE MORENO *et al.*, 1986) e em interações hidrofóbicas (FOUNTOULAKIS *et al.*, 1992). Após a ligação às proteínas, ocorre uma mudança no perfil cromático entre 465-595 nm, 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.

5.4 Eletroforese bidimensional

5.4.1 Reidratação das tiras de gel

A primeira etapa da fase unidimensional consiste na reidratação das *strips* juntamente com a amostra. Foram utilizadas tiras de IPG (*Immobilized pH Gel* - GE Healthcare) com gradiente de pH na faixa de 4-7. A reidratação ocorreu em suporte de acrílico (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray* - GE Healthcare), com doze canaletas, onde foram aplicadas as soluções contendo o tampão de reidratação (7M de uréia, 2M de tiouréia, 50mM DTT, 0,5% IPG *buffer*, Azul de Bromofenol e 2% CHAPS – 3-[(3-cholamido propyl) dimethyl ammonio]-1-propanesulfonate) e a amostra, num total de 250 µL. As tiras foram assentadas com a superfície do gel voltada para baixo e, em seguida, cobertas com 2 mL de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid* - GE Healthcare), evitando a cristalização da uréia e o ressecamento das *strips*. O período de reidratação foi de 16 horas, em temperatura ambiente.

5.4.2 Focalização isoelétrica (IEF)

A segunda etapa consiste na Focalização Isoelétrica na qual as proteínas separam em função de seus pontos isoelétricos (pI). As tiras foram transferidas do suporte de acrílico para uma placa de cerâmica (*Manifold* - GE Healthcare), também com 12 canaletas, e recobertas com *DryStrip Cover Fluid*. A Focalização Isoelétrica foi realizada no sistema de eletroforese *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare), com o programa específico para a tira de 13 cm, pH 4-7 não-linear (QUADRO 03), em temperatura de 20°C, durante 5 horas. O tempo de isoeletrofocalização foi de 5 horas. As tiras foram, na seqüência, armazenadas a 80°C negativos.

ETAPA	VOLTAGEM (V)	TEMPO (h; min)	kVh
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

QUADRO 03 – PROGRAMA PARA O *ETTAN IPGPHOR II*, EM TIRAS DE 13cm (PH 4-7)

NOTA: **V**- voltagem; **h** - hora; **min** - minutos; e **kVh** - kilovolts/ hora.

FONTE: o autor (2011)

5.4.3 Equilíbrio das tiras

As tiras foram equilibradas por duas vezes, num tempo de 15 minutos cada, em temperatura ambiente, antes de prosseguir para a segunda dimensão. A primeira fase foi realizada em 5 ml de tampão de equilíbrio (50mM de Tris-HCl – pH 8,8, 6M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS e Azul de Bromofenol) acrescido de 50mM de DTT. Na segunda, as tiras foram imersas em 5 ml de tampão de equilíbrio e 4,5% de iodoacetamida, prevenindo a sua reoxidação durante a eletroforese.

5.4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% (água *milliQ*, 30% mix acrilamida/bis-acrilamida, 1,5M Tris – pH 8,8, 10% SDS, 10% de Persulfato de Amônio e 16 µl de TEMED), com dimensões de 18 x 16 cm. Durante a montagem, as tiras IPG foram submersas, por alguns segundos, em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM Glicina e 0,1% SDS) e, em seguida, posicionadas horizontalmente no topo do gel. Marcadores de massa molecular (LMW) conhecida, entre 14 e 97 kDa (GE Healthcare), foram aplicados em papel filtro e posicionados sobre o gel à esquerda da tira. As tiras e o LMW foram selados com solução de agarose (0,5% agarose, Tampão de Corrida e Azul de Bromofenol).

A corrida eletroforética foi realizada sob temperatura constante (11°C), mantida pelo circulador termostático *Multitemp II*, utilizando o sistema eletroforético *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare). A eletroforese ocorreu a 15 mA/gel nos 30 minutos iniciais, sendo o restante da corrida realizado com 30mA/gel. A corrida foi interrompida com a linha de migração aproximadamente a 1 cm do final do gel 2D. A duração total foi de aproximadamente 4 horas e 30 minutos. Todas as etapas e soluções utilizadas no 2D-PAGE foram adaptadas e desenvolvidas a partir do protocolo fornecido pelo fabricante do aparelho (*2-D Electrophoresis Principles and Methods*, 2005).

5.4.5 Coloração do gel 2D

A coloração utilizada para os géis foi o *Coomassie* coloidal adaptada de WESTERMEIER, 2006. As proteínas foram fixadas ao gel em solução contendo 1,3% (w/v) ácido fosfórico e 20% (v/v) metanol, durante 1 hora. Após esta etapa, o gel foi corado em 300 ml de solução corante (1,5% ácido orto-fosfórico 85%; 7,7% sulfato de amônio e 0,01% *Coomassie* G-250) sob leve agitação por um período de 16 a 24 horas. Os géis foram descorados em água destilada e o armazenamento foi realizado em solução 1% ácido acético a 4°C.

5.4.6 Digitalização e análise das imagens

As imagens foram digitalizadas utilizando o equipamento *ImageScannertm II* (GE Healthcare) e a análise das imagens realizada pelo software *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os parâmetros para a detecção das bandas pelo programa foram os seguintes: *min area* – 5; *smooth* – 3; e *saliency* – 25; onde: *min area* reduz artefatos; *smooth* elimina ruídos do *spot* e define a resolução em sobreposições; *saliency* delimita a curvatura do *spot*. Após a detecção automática, os *spots* foram checados manualmente. Para o pareamento (*matching*) correto do *software* entre as replicatas da mesma amostra e entre tumor primário e linfonodo, foram selecionados 5 bandas comuns de referência, os denominados *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 os marcadores com massa molecular conhecida, entre 14.4 e 97 kDa (GE Healthcare).

O programa utiliza como parâmetro para a análise estatística o volume relativo das bandas. A normalização do volume dos pontos protéicos detectados considera o volume total dos pontos protéicos, no qual o volume de cada ponto é dividido pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100. Tais dados foram analisados estatisticamente através do teste *t* de Student, considerando como bandas diferencialmente expressas as que apresentassem uma variação estatística significativa ($p < 0,05$).

5.5 Espectrometria de massas

5.5.1 Seleção de spots em gel 2D

As bandas de interesse foram manualmente removidas do gel com o auxílio de ponteiros estéreis e descoradas, por uma hora, em tubos de eppendorf (0,5 ml)

contendo 300 µl de solução 50% acetonitrila, 25mM bicarbonato de amônio. O procedimento foi repetido, quantas vezes necessárias, até a completa descoloração. Em seguida, as bandas foram submetidas a duas etapas de desidratação em 100 µl de acetonitrila 100%, por 5 minutos cada. O produto descorado e desidratado foi armazenado a 20° C negativos.

Para a digestão proteolítica, as bandas selecionadas foram reidratadas em 15 µl de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin/* Promega) (15ng/µL em tampão contendo 40mM bicarbonato de amônio e 10% acetonitrila) durante 30 minutos em banho de gelo. A digestão foi realizada a 37°C por 16 a 20 horas. A solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético saturada com matriz de HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico). O volume final de 2 µl foi aplicado em placa para MALDI SCOUT MTP íon source 384 targets (*Bruker Daltonics*) e MassPREP™ PROtarget™ 96 DIOS-target Plates (*Waters Corporation*).

Quando necessária, a purificação dos peptídeos foi realizada utilizando ponteiras com coluna de fase reversa “PerfectPure C-18 Tip” (Eppendorf). A ponteira foi pré-umidificada duas vezes com 10 µl de 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético e equilibrada duas vezes com 10 µl de 0,1% ácido trifluoracético. Em seguida, a amostra foi aspirada e expelida dez vezes. A amostra foi lavada cinco vezes com 0,1% ácido trifluoracético para retirar contaminantes e os peptídeos foram eluidos da coluna diretamente na placa para análise em 2 µl de solução 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA.

5.5.2 Análise dos espectros de massas

As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo *Autoflex II* (*Bruker Daltonics*), instalado no departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 nano segundos entre o pulso de *laser* e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da. 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 (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros MS foi feita utilizando o programa *FlexAnalysis 2.0* (Bruker Daltonics). Dados da fragmentação de peptídeos (espectro MS/MS) foram obtidos através do programa *FlexControl 3.0* (Bruker Daltonics).

Outro espectrômetro de massas, MALDI-Tof/MS micro MX (*Waters Corporation*), do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foi utilizado para complementar as identificações. Os espectros foram obtidos no modo reflectron, com a trajetória de voo projetada para análises de alta resolução. A configuração do detector linear tem um comprimento de 1,2 m e energia do laser igual a 150, complementado por um detector de aceleração (PAD), com faixa de aquisição entre 500 Da e 3.000 Da. A calibração externa foi realizada utilizando um calibrante mix contendo polietilenoglicol (PEG) 200, 600 e 1.000, com iodeto de sódio, rubídio e cesium (NaRbCsI). O programa de computador utilizado para análise dos peptídeos foi o *MassLynx 4.0* (*Waters Corporation*).

5.5.3 Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas a partir do padrão de massas obtido (PMF – *peptide mass fingerprinting*) e fragmentação peptídica (MS/MS), utilizando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) associado ao banco de dados *SWISS-PROT*. Os parâmetros de busca foram: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, *Homo Sapiens (human)*, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa, e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância máxima foi de 100 ppm (partes por milhão) e 0,60 Da (FIGURA 09).

Os critérios utilizados para a identificação protéica incluem:

- MASCOT score de probabilidade: é o valor atribuído à identificação pelo programa de busca. O valor mínimo a partir do qual a identificação deixa de ser considerada aleatória, varia de acordo com a taxonomia

da amostra. Em buscas por proteínas humanas, utilizando o banco de dados *Swiss-Prot* e o programa MASCOT, esse valor é 56. Quanto maior o *score*, maior a confiabilidade na identificação;

- Percentual da cobertura de seqüência: este valor indica o quanto da seqüência de aminoácidos da proteína sugerida foi coberto pelos peptídeos resultantes da digestão trípica da amostra. Foram considerados satisfatórios valores acima de 20%;
- Número de peptídeos sobrepostos: corresponde aos picos de massa obtidos por MS e que foram pareados com as massas teóricas, provenientes da clivagem *in silico*. Estes valores são fornecidos pelo programa de busca MASCOT. Os valores teóricos são fornecidos pelo programa de busca MASCOT;
- Dados de MM e PI esperados: valores teóricos (calculados) de massa molecular e ponto isoelétrico.

Para considerar como positiva a identificação, a proteína tem que atender pelo menos dois dos critérios acima mencionados. Os nomes e siglas utilizados para as proteínas foram os indicados no banco de dados *Expasy - UniProtKB/Swiss-Prot* (<http://www.expasy.ch/>).

MATRIX SCIENCE

Mascot > Peptide Mass Fingerprint

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name	<input type="text" value="Heloisa Zaccaron Milioli"/>	Email	<input type="text"/>
Search title	<input type="text"/>		
Database(s)	<input type="text" value="SwissProt"/> <input type="text" value="NCBItr"/> <input type="text" value="contaminants"/> <input type="text" value="cRAP"/> <input type="text" value="MSDB"/>	Enzyme	<input type="text" value="Trypsin"/>
		Allow up to	<input type="text" value="1"/> missed cleavages
Taxonomy	<input type="text" value="..... Homo sapiens (human)"/>		
Fixed modifications	<input type="text" value="Carbamidomethyl (C)"/> <input type="checkbox"/> Display all modifications	<input type="button" value=">"/> <input type="button" value="<"/>	<input type="text" value="Acetyl (K)"/> <input type="text" value="Acetyl (N-term)"/> <input type="text" value="Acetyl (Protein N-term)"/> <input type="text" value="Amidated (C-term)"/> <input type="text" value="Amidated (Protein C-term)"/> <input type="text" value="Ammonia-loss (N-term C)"/> <input type="text" value="Biotin (K)"/> <input type="text" value="Biotin (N-term)"/> <input type="text" value="Carbamyl (K)"/> <input type="text" value="Carbamyl (N-term)"/> <input type="text" value="Carboxymethyl (C)"/>
Variable modifications	<input type="text" value="Oxidation (M)"/>	<input type="button" value=">"/> <input type="button" value="<"/>	
Protein mass	<input type="text"/> kDa	Peptide tol. ±	<input type="text" value="100"/> ppm
Mass values	<input checked="" type="radio"/> MH ⁺ <input type="radio"/> M _r <input type="radio"/> M-H ⁻		
Monoisotopic	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>		
Data file	<input type="button" value="Escolher arquivo"/> Nenhum arq...lecionado		
Query	<input type="text"/> <small>NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.</small>		
Decoy	<input type="checkbox"/>		
Report top	<input type="text" value="AUTO"/> hits		
<input type="button" value="Start Search ..."/>		<input type="button" value="Reset Form"/>	

Copyright © 2008 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved.

FIGURA 09 – PARÂMETROS DE BUSCA (PMF – PEPTIDE MASS FINGERPRINT), utilizando o programa MASCOT associado ao banco de dados SWISS-PROT.
 FONTE: Disponível em <<http://www.matrixscience.com/>>

6. RESULTADOS

6.1 Identificação das amostras

Os fragmentos de tumores primários e linfonodos axilares foram obtidos de pacientes em diferentes estágios clínicos. O grupo experimental (QUADRO 04), composto por oito mulheres, apresentou média de idade de $60,25 \pm 8,63$ anos. Sete (87,5%) pacientes apresentaram ‘Carcinoma Ductal Invasivo’ e apenas uma (12,5%) o ‘Carcinoma Lobular Invasivo’, com a frequência esperada para estes tipos de neoplasia.

Histologicamente, os carcinomas mamários avaliados com base em parâmetros de diferenciação celular, formação do túbulo/ glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas – critérios propostos por *Scarff-Bloom* e *Richardson* (1957), modificados por *Elston* e *Ellis* (1991) – apresentaram resultados de *score* distintos: bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) ou pouco diferenciados (grau III), respectivamente, em duas (25%), quatro (50%) e duas (25%) pacientes.

AMOSTRA	IDADE	TIPO HISTOLÓGICO	GRAU	TAMANHO (mm)	LP/TL	RE	RP
CP 622	71 anos	Carcinoma Ductal Invasor	I	30	P (18/19)	P	P
CP 627	61 anos	Carcinoma Ductal Invasor	III	20	P (06/15)	P	P
CP 630	49 anos	Carcinoma Ductal Invasor	I	15	P (06/30)	P	P
CP 633	71 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	40	P (26/29)	P	P
CP 638	48 anos	Carcinoma Lobular Invasor	II	70	P (35/38)	P	P
CP 641	58 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	100	P (01/10)	N	N
CP 644	61 anos	Carcinoma Ductal Invasor	III	35	P (07/07)	N	N
CP 645	63 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	58	P (03/29)	P	P

QUADRO 04 – CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL

NOTA: **LP** - Número de linfonodos positivos; **TL** - número total de linfonodos analisados; **RE** - Receptor de Estrogênio; **RP** - Receptor de Progesterona; **P** - Positivo; **N** - Negativo.

FONTE: o autor (2011)

O tamanho médio dos tumores avaliados foi de 46,0 ±28,5 mm, variando entre 15 mm e 100 mm. De maior relevância, a presença (Positivo) ou ausência (Negativo) de células tumorais no linfonodos, um indicador da disseminação tumoral para o sistema linfático. Todas as pacientes do grupo amostral, como pré-requisito para o estudo, apresentaram *status* de linfonodo positivo, identificando-se 102 (58%) positivos num total de 177 linfonodos analisados. Através de análise imunohistoquímica, os *status* 'Receptor de Estrogênio' e 'Receptor de Progesterona' foram positivos em seis (75%) e negativos em duas (25%) amostras, e ocorreram simultaneamente nas pacientes.

6.2 Extração e quantificação protéica

A metodologia de extração protéica utilizada para tecido mamário não-tumoral e tumores primários de mama foi implementada no LCHO em 2008 e 2009, de acordo com o protocolo descrito em 'Material e Métodos', e mostrou-se eficiente também para linfonodos axilares. No processamento das amostras durante a etapa de lise, as células são rompidas através de métodos químicos, tampão de lise acrescido de inibidor de protease (PMSF), e físicos, com o auxílio de homogeneizador elétrico para a dissociação do tecido. A perda de material é inevitável durante a ruptura celular e solubilização das proteínas, no entanto, o equipamento se mostrou capaz de minimizar esse dano.

Para a quantificação protéica optou-se pela técnica de Bradford, rápida e sensível. Foram efetuadas leituras de absorbância da solução de Bradford (200 µl de reagente de Bradford diluído 1:5 em água ultra pura), considerado "branco" na quantificação, e à solução de Bradford foram acrescidas proteínas solubilizadas em tampão de lise em seis volumes: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 µl, para aumentar a linearidade da reação. Foram aplicados em cada gel 1.000 µg de proteínas. A quantidade de material utilizado para a obtenção dos extratos e os valores das concentrações protéicas de cada amostra estão descritos nos QUADROS 05 e 06.

AMOSTRA LINFONODO AXILAR	QUANTIDADE UTILIZADA (g)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (µg/µl)
CP 622L	0,299	17,96
CP 627L	0,170	15,81
CP 630L	0,342	23,64
CP 633L	0,400	22,14
CP 638L	0,340	22,24
CP 641L	0,400	24,80
CP 644L	0,101	11,28
CP 645L	0,396	22,69

QUADRO 05 – AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES UTILIDADAS NA EXTRAÇÃO E O RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

NOTA: **g** - grama; **µg/µl** - micrograma/microlitro.

FONTE: o autor (2011)

AMOSTRA TUMOR PRIMÁRIO	QUANTIDADE UTILIZADA (g)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (µg/µl)
CP 622T	0,354	13,50
CP 627T	0,400	11,02
CP 630T	0,400	16,48
CP 633T	0,400	8,36
CP 638T	0,400	11,92
CP 641T	0,400	19,83
CP 644T	0,383	17,50
CP 645T	0,400	14,24

QUADRO 06 – AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS UTILIDADAS NA EXTRAÇÃO E O RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

NOTA: **g** - grama; **µg/µl** - micrograma/microlitro.

FONTE: o autor (2011)

6.3 Metodologias proteômicas

O estabelecimento de um protocolo de extração eficiente seguido de eletroforese bidimensional (2D PAGE) é essencial para se obter bons resultados em proteômica. A escolha da faixa de pH imobilizado (4-7), previamente definida em

2008 no LCHO, opta por avaliar o maior número de proteínas possível dentro do espectro intermediário desejado, com melhor resolução entre as bandas.

A isoeletrofocalização foi primeiro realizada em uma das tiras e, posteriormente, outras duas focalizaram simultaneamente, somando três replicatas da mesma amostra. Três perfis de tumor primário e linfonodo axilar foram utilizados para aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade das proteínas nos géis bidimensionais. A escolha da seqüência de trabalho, entretanto, não garante a reprodutibilidade ideal entre todas as tiras, por outro lado, pode evitar perda de material em caso de problemas durante a metodologia. A segunda dimensão, na seqüência, também ocorreu com pelo menos duas amostras iguais da paciente.

O estudo utiliza 18 géis de tumores primários, referente às replicatas das amostras com os códigos CP 622T, CP 627T, CP 630T, CP 633T, CP 644T, CP 645T, previamente reproduzidos para análise proteômica do perfil expresso em carcinomas mamários. Foram confeccionados trinta novos géis como replicatas das seguintes amostras: CP 622L, CP 627L, CP 630L, CP 633L, CP 638L, CP 638T, CP 641L, CP 641T, CP 644L, CP 645L. No total, oito pacientes (48 géis bidimensionais) com amostras pareadas de tumor primário e respectivo linfonodo axilar foram analisadas de forma comparativa.

6.4 Análise dos géis bidimensionais

As imagens das replicatas foram interpretadas no programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os parâmetros para a detecção de *spots* ou bandas foram: *min area* – 5, que reduz artefatos; *smooth* – 3, elimina ruídos e define a resolução em caso de sobreposição; e *saliency* – 25, que delimita os *spots*. Após a detecção automática, os *spots* foram conferidos manualmente. As replicatas apresentaram um valor médio de 852 *spots* entre as amostras de linfonodos e 703 entre tumores. O número de bandas detectadas em cada replicata está descrito no QUADRO 07.

AMOSTRA LINFONODO AXILAR	GEL	Nº DE BANDAS DETECTADAS	AMOSTRA TUMOR PRIMÁRIO	GEL	Nº DE BANDAS DETECTADAS
CP 622L	L1	724	CP 622T	T1	735
	L2*	570		T2	752
	L3	724		T3*	591
CP 627L	L1*	1.018	CP 627T	T1*	530
	L2	1.029		T2	476
	L3	951		T3	559
CP 630L	L1	938	CP 630T	T1	824
	L2*	874		T2*	866
	L3	954		T3	791
CP 633L	L1	997	CP 633T	T1*	535
	L2*	794		T2	500
	L3	669		T3	450
CP 638L	L1	905	CP 638T	T1*	440
	L2	1.084		T2	230
	L3*	933		T3	220
CP 641L	L1	591	CP 641T	T1	760
	L2	769		T2	883
	L3*	747		T3*	837
CP 644L	L1	558	CP 644T	T1	741
	L2	719		T2*	917
	L3*	761		T3	995
CP 645L**	L1	956	CP 645T**	T1	1.108
	L2	1.141		T2	1.169
	L3*	1052		T3*	972

QUADRO 07 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS EM GÉIS BIDIMENSIONAIS DE AMOSTRAS DE LINFONODO AXILAR E TUMOR PRIMÁRIO

NOTA: L1, L2, L3 - géis em triplicatas de amostras de linfonodo axilar; T1, T2, T3 - géis em triplicatas de tumores primários; * - gel referência; ** - amostra referência.

FONTE: o autor (2011)

Entre as três replicatas da amostra, um gel bidimensional de referência foi determinado para cada linfonodo axilar e tumor primário. O referência ou *master* é definido como o gel que melhor caracteriza a amostra e, geralmente, apresenta o

maior número de bandas da triplicata e/ou dispõe de *spots* bem delimitados e distribuídos na área do gel. Os *masters* observados foram: CP 622L2, CP 622T3, CP 627L1, CP 627T1, CP 630L2, CP 630T2, CP 633L2, CP 633T1, CP 638L3, CP 638T1, CP 641L3, CP 641T3, CP 644L3, CP 644T2, CP 645L3 e CP 645T3 (QUADRO 07). A amostra mais representativa escolhida como referência entre todos os linfonodos axilares foi CP 645L e em tumores primários CP 645T (FIGURAS 10 e 11).

Para o pareamento (*matching*) correto do *software* entre as três replicatas da mesma amostra e, posteriormente, para análises comparativas entre linfonodos e tumores primários foram selecionadas cinco bandas comuns, denominadas *landmarks* (FIGURA 13), como base de identificação para o programa. Os resultados do pareamento foram conferidos um a um, sendo alterados quando incorretos. A reprodutibilidade das triplicatas comparadas variou entre 70,59% em CP 641T1 e 97,99% em CP 644L1, considerando o *matching* em relação ao gel referência. Quando pareados os géis da amostra referência, linfonodos e tumores mostraram cobertura de bandas entre 80,35 e 92,67% (CP 645L) e 87,57 e 95,01% (CP 645T).

A amostra CP 638T, diferente das demais, apresentou número relativamente baixo de *spots* (440, 230, 220), e não se mostrou fidedigna para análise comparativa com o respectivo linfonodo axilar (905, 1084, 933), com pareamento de apenas 32,58% entre os géis referência, inferior a 50% sugerido como critério de seleção (FIGURA 12). Optou-se pela exclusão, uma vez que resultados controversos poderiam comprometer o restante da análise. Ao eliminar CP 638, uma amostra de Carcinoma Lobular Invasivo, a análise comparativa permaneceu homoganeamente restrita ao tipo Carcinoma Ductal Invasivo e respectivo linfonodo axilar.

Foram realizadas, na seqüência, análises qualitativas, selecionando *spots* diferencialmente expressos, e quantitativas, considerando a presença ou ausência dos *spots* nos géis comparados. O programa utiliza como parâmetro para a análise estatística o volume relativo das bandas. A normalização do volume dos pontos detectados considera o volume total das bandas protéicas, no qual o volume de cada ponto é dividido pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *t de Student*, considerando como bandas diferenciais as que apresentam volume alterado acima de duas vezes e variação estatística significativa, com $p < 0,05$.

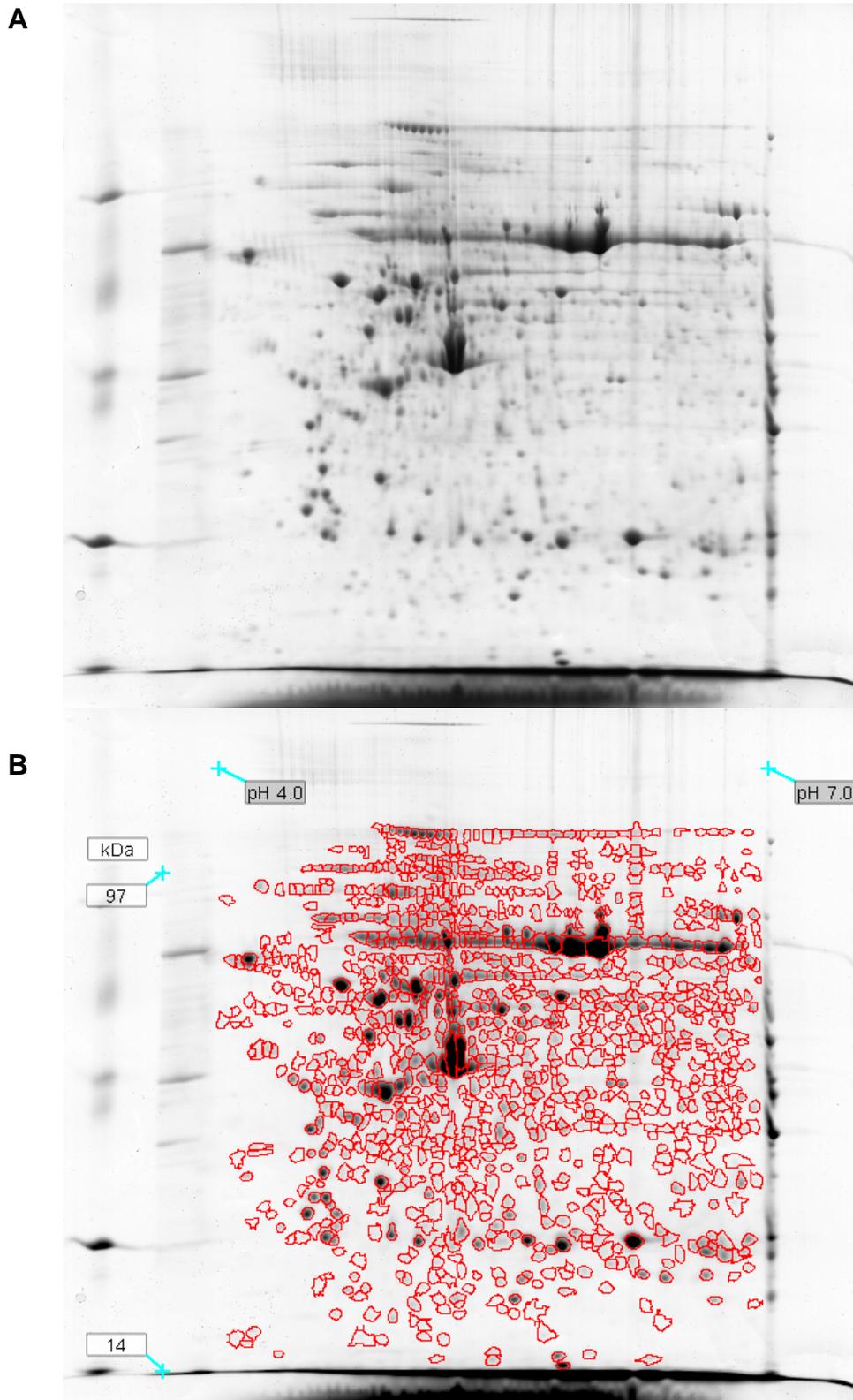


FIGURA 10 – GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 645L3. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. **A** - Imagem capturada com ajuste de contraste; **B** - Imagem após a detecção de 1052 spots e plotagem de pI e MM. As bandas detectadas pelo programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* estão destacadas em vermelho.
 FONTE: o autor (2011).

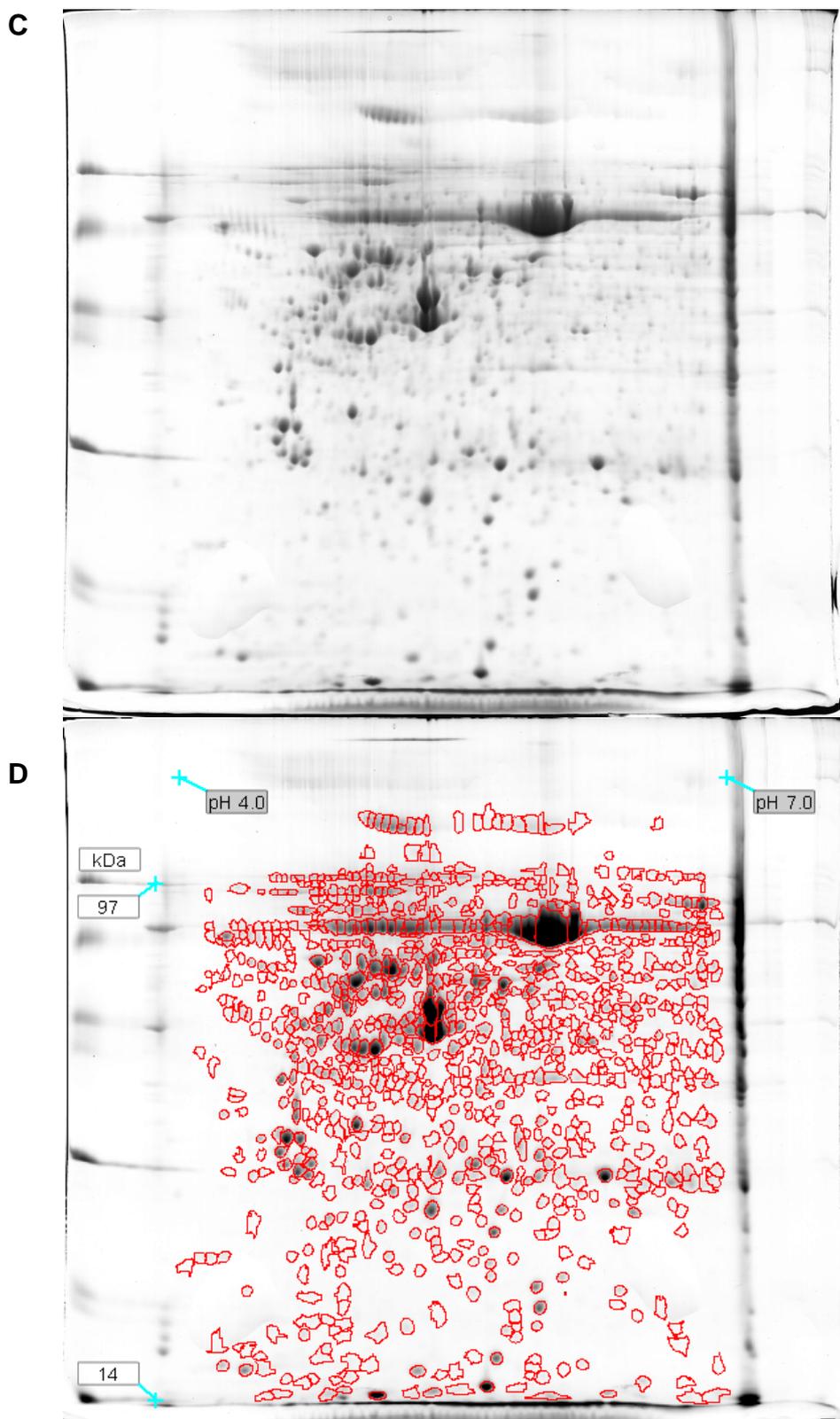


FIGURA 11 – GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 645T3. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliácridamida 10%, corado com coomassie coloidal. **C** - Imagem capturada com ajuste de contraste; **D** - Imagem após a detecção de 972 spots e plotagem de pI e MM. As bandas detectadas pelo programa *ImageMaster[™] 2D Platinum v6.0* estão destacadas em vermelho.
FONTE: o autor (2011).

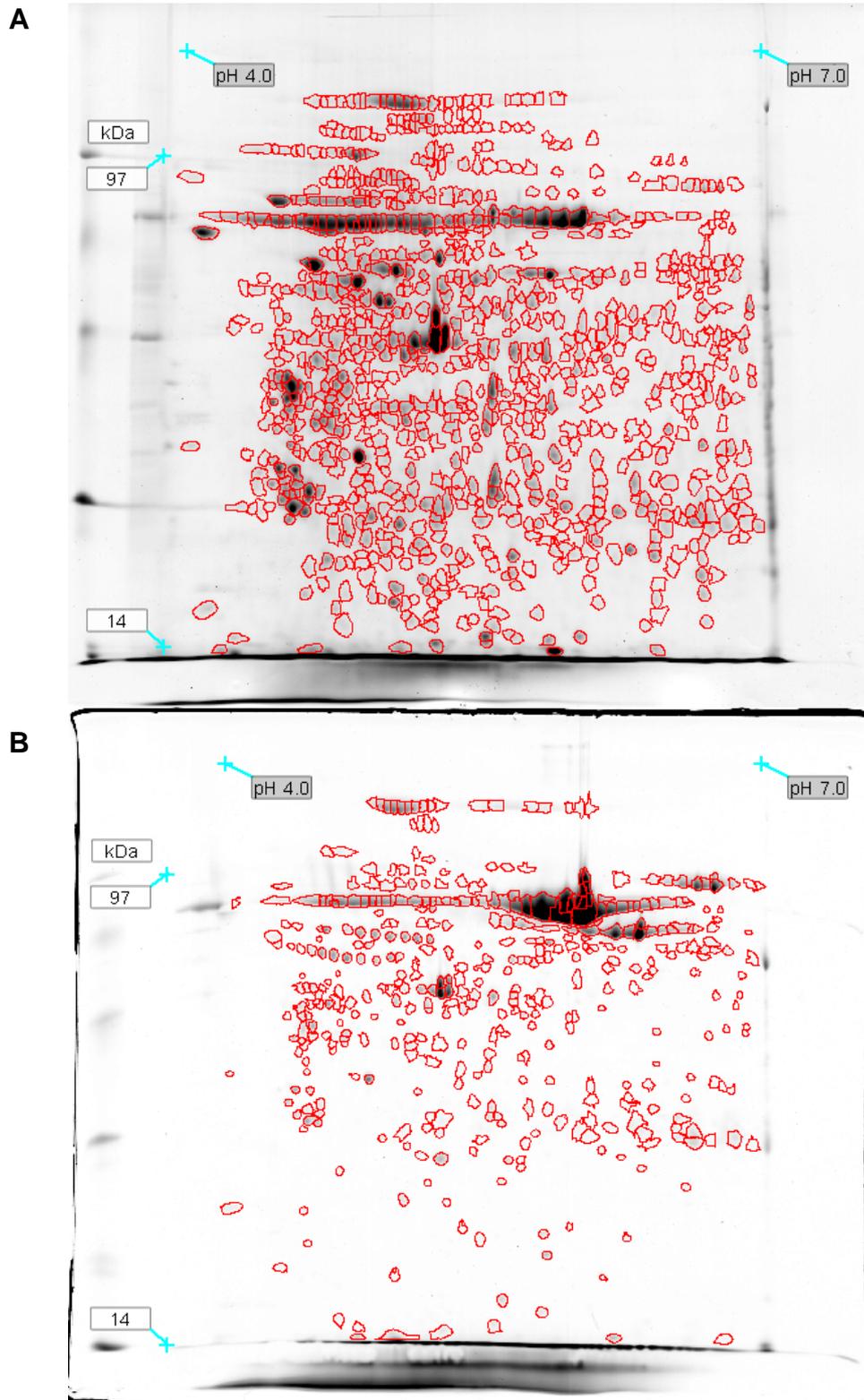


FIGURA 12 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DA AMOSTRA CP 638L3 E CP 638T1. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas detectadas pelo programa *ImageMaster[™] 2D Platinum v6.0* estão destacadas em vermelho. MM e pl aparecem plotados nos eixos y e x, respectivamente. **A** - Imagem representativa com 933 *spots* identificados; **B** - Imagem após a detecção de 440 *spots*, com baixa reprodutibilidade. FONTE: o autor (2011).

6.5 Análise comparativa do conjunto amostral dos linfonodos axilares e dos tumores primários

O projeto inicial elaborado no programa *ImageMastertm* comparou os dados do grupo amostral de linfonodos axilares e de tumores primários de mama, após a análise homogênea de cada conjunto amostral. As imagens para a avaliação entre os diferentes grupos se referem aos géis *masters* de CP 645L e CP 645T. Foram considerados relevantes os *spots* cujas variações puderam ser visualmente observadas e confirmadas pelos parâmetros do *software*, com resultado significativo da análise estatística. A comparação interclasse mostrou apenas nove *spots* diferenciais entre os géis de referência, sendo três presentes nos linfonodos e ausentes nos tumores, e seis observados somente nas amostras tumorais (TABELA 02). A análise estatística se mostrou, neste caso, igualmente significativa ($p < 0,001$) nas bandas.

TABELA 02 – SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O CONJUNTO DE AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES E DE TUMORES PRIMÁRIOS

CP 645L*					
L.ID	T.ID	VD - CP 645L3	Teste t	GL	p<
2721		1000000	4,722	13	0,001
3161		1000000	5,146	12	0,001
3353		1000000	5,733	13	0,001
CP 645T*					
T.ID	L.ID	VD - CP 645T3	Teste t	GL	p<
3369		1000000	7,887	18	0,001
3551		1000000	20,31	19	0,001
3581		1000000	7,811	16	0,001
3594		1000000	4,853	10	0,001
3636		1000000	6,120	18	0,001
3651		1000000	5,456	15	0,001

NOTA: * - amostra referência; **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário;

VD - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de **p**.

FONTE: o autor (2011).

Os *spots* diferenciais (FIGURA 13) foram excisados, digeridos e submetidos a análise no espectrômetro de massas, que identificou seis diferentes proteínas (TABELA 03). Dentre essas, quatro: Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B); Microtúbulo-actina, factor de ligação 1 (MACF1); Vinculina (VINC); e Navegador 2 de neurônio (NAV2), estavam expressas em *spots* presentes apenas em linfonodos axilares; e outros dois, correspondentes a Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1) e Vimentina (VIME), presentes somente em tumores primários de mama. Três bandas não apresentaram resultado significativo de identificação dentro dos critérios avaliados.

O código de acesso da proteína no *SwissProt*, bem como a referência de entrada no *UniGene* e o respectivo *locus* gênico, aparecem registrados na TABELA 03 como dados relevantes. Estão presentes também o percentual de cobertura dos peptídeos identificados e o *score* de cada proteína identificada na busca PMF, representado por um valor de expectativa que indica a probabilidade de não ser um evento randômico.

A análise dos conjuntos amostrais, todos os linfonodos axilares comparado a todos os tumores primários, contudo, sugere um resultado pouco representativo que reflete, em parte, interpretações subjetivas desenvolvidas pelo programa *ImageMastertm*, já que o mesmo considera apenas os *spots* presentes nos géis de referência para a comparação dos perfis protéicos. Os valores correspondentes ao volume de cada *spot* pareado, entre replicatas da mesma amostra ou dentro do mesmo grupo (linfonodos ou tumores), estão inseridos na análise estatística, no entanto, são considerados somente quando há um representante comum no gel *master*. Neste contexto, as bandas diferenciais presentes nos demais géis do conjunto amostral de linfonodos ou tumores são desconsideradas. O *software* também não permite uma avaliação estatística detalhada intraclasse, ou seja, entre amostras de linfonodos axilares ou entre as de tumores primários, isoladas.

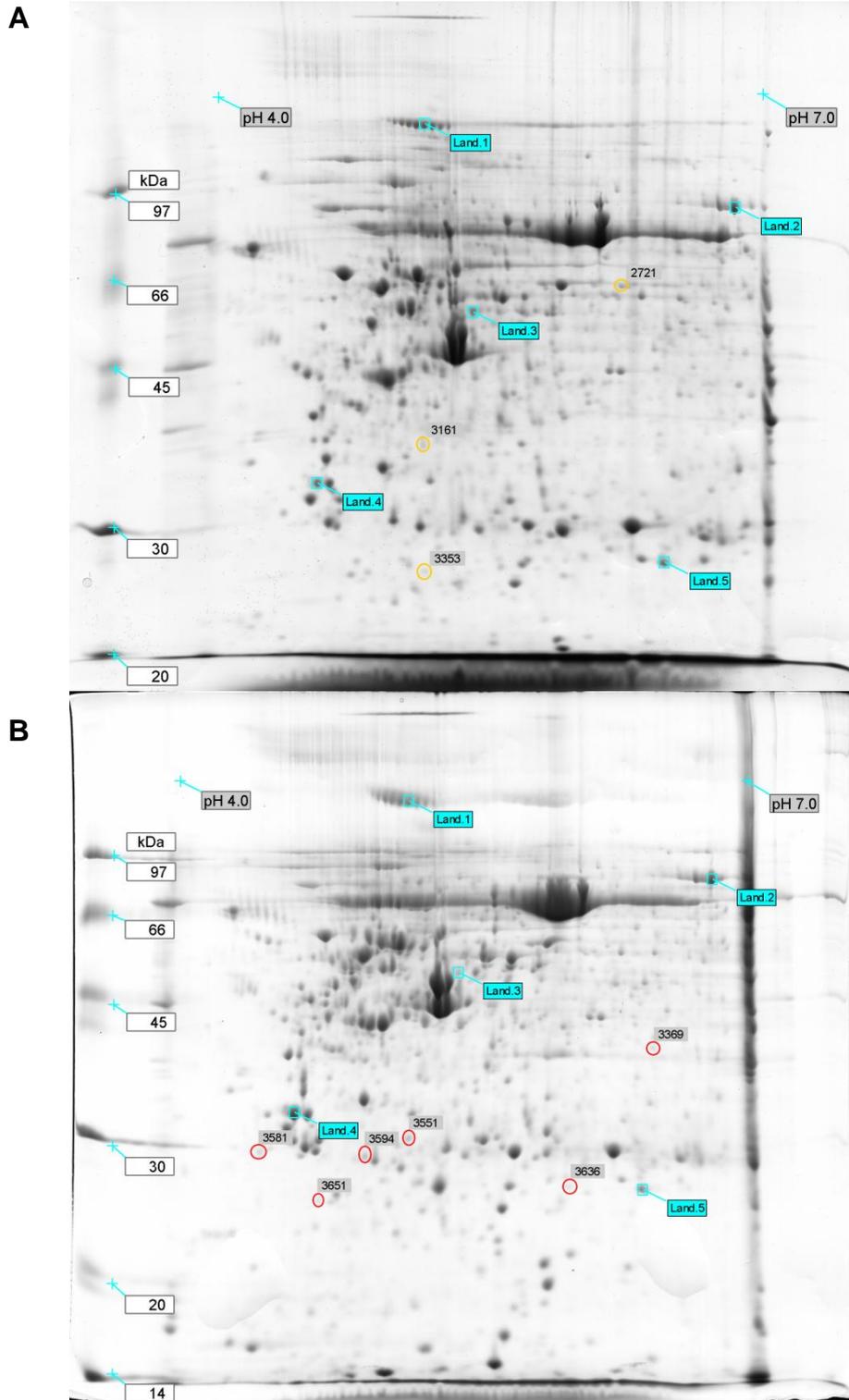


FIGURA 13 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DAS AMOSTRAS CP 645L3 E CP 645T3 COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO CONJUNTO DE LINFONODOS AXILARES E DE TUMORES PRIMÁRIOS. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster[™]* estão destacadas em: (A) amarelo, presentes apenas em linfonodos; e (B) vermelho, apenas em tumores. *Landmarks* indicam *spots* comuns marcados nas amostras
 FONTE: o autor (2011).

TABELA 03 – IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O CONJUNTO DE AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES E DE TUMORES PRIMÁRIOS

CP 645L* ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pt ^c esp. MM/pt obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
2721	-				-		
3161	Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B_HUMAN)	P62140	PPP1CB	2p23.2	62.00/6.20 37.96/5.85 37.00/5.10	64	50
3353	Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1_HUMAN)	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	62.36/5.27 26.00/5.11	73	29
	Vinculina (VINC_HUMAN)	P18206	VCL	10q22.2	12.43/5.50 26.00/5.11	63	41
	Navegador 2 de neurônio (NAV2_HUMAN)	Q8IVL1	NAV2	11p15.1	26.93/9.13 26.00/5.11	58	28
CP 645T* ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pt ^c esp. MM/pt obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
3369	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 39.00/6.52	68	38
3551	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 30.00/5.18	97	58
	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 30.00/5.18	64	39
3581	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 29.00/4.37	56	30
3594	-				- 29.00/4.95		
3636	-				- 26.00/6.06		

3651	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 25.00/4.69	89	29
------	---	--------	------	----------	--------------------------	----	----

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d *Score* obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

Algumas imagens mostram variações de expressão entre amostras de diferentes pacientes dentro do mesmo grupo, evidenciando possíveis diferenças entre indivíduos ou tipos tumorais (FIGURAS 14, 15 e 16).

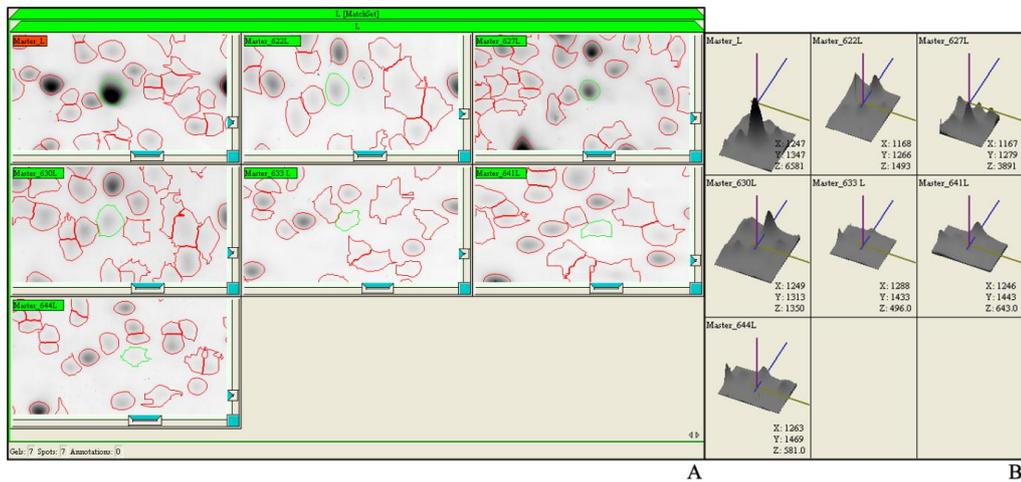


FIGURA 14 – IMAGENS DE SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS ENTRE AMOSTRAS DE LINFONODOS AXILARES. As bandas detectadas pelo programa *ImageMastertm* podem ser visualizadas quanto a diferenças de expressão nos géis (A) e melhor avaliadas de acordo com a imagem tridimensional dos spots (B), representada pelas coordenadas x e y referentes a área, e o eixo z correspondente ao volume.

FONTE: o autor (2011).

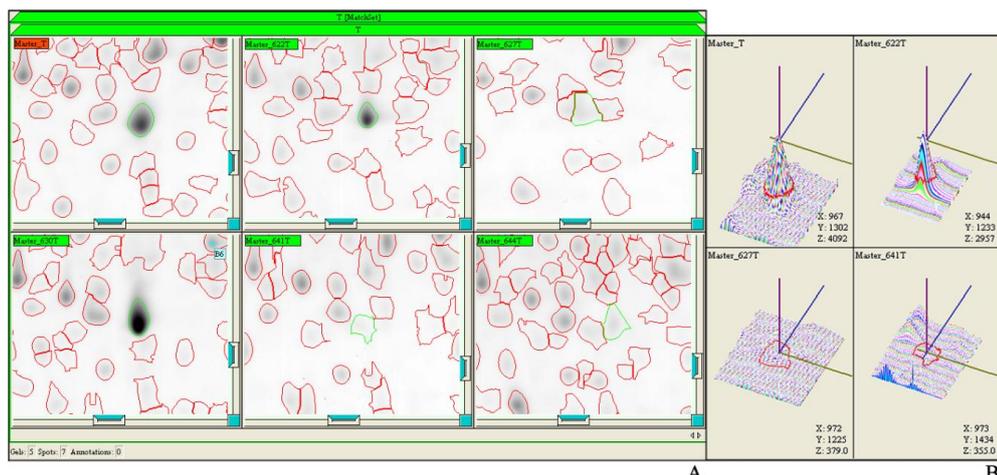


FIGURA 15 – IMAGENS DE SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS ENTRE AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. As bandas detectadas pelo programa *ImageMastertm* podem ser visualizadas quanto a diferenças de expressão nos géis (A) e melhor avaliadas de acordo com a imagem tridimensional dos spots (B), representada pelas coordenadas x e y, referentes a área, e o eixo z para o volume. Neste caso, foram selecionadas as amostras CP 622T, CP 627T, CP 641T e CP 645T, com valores de expressão variados.

FONTE: o autor (2011).

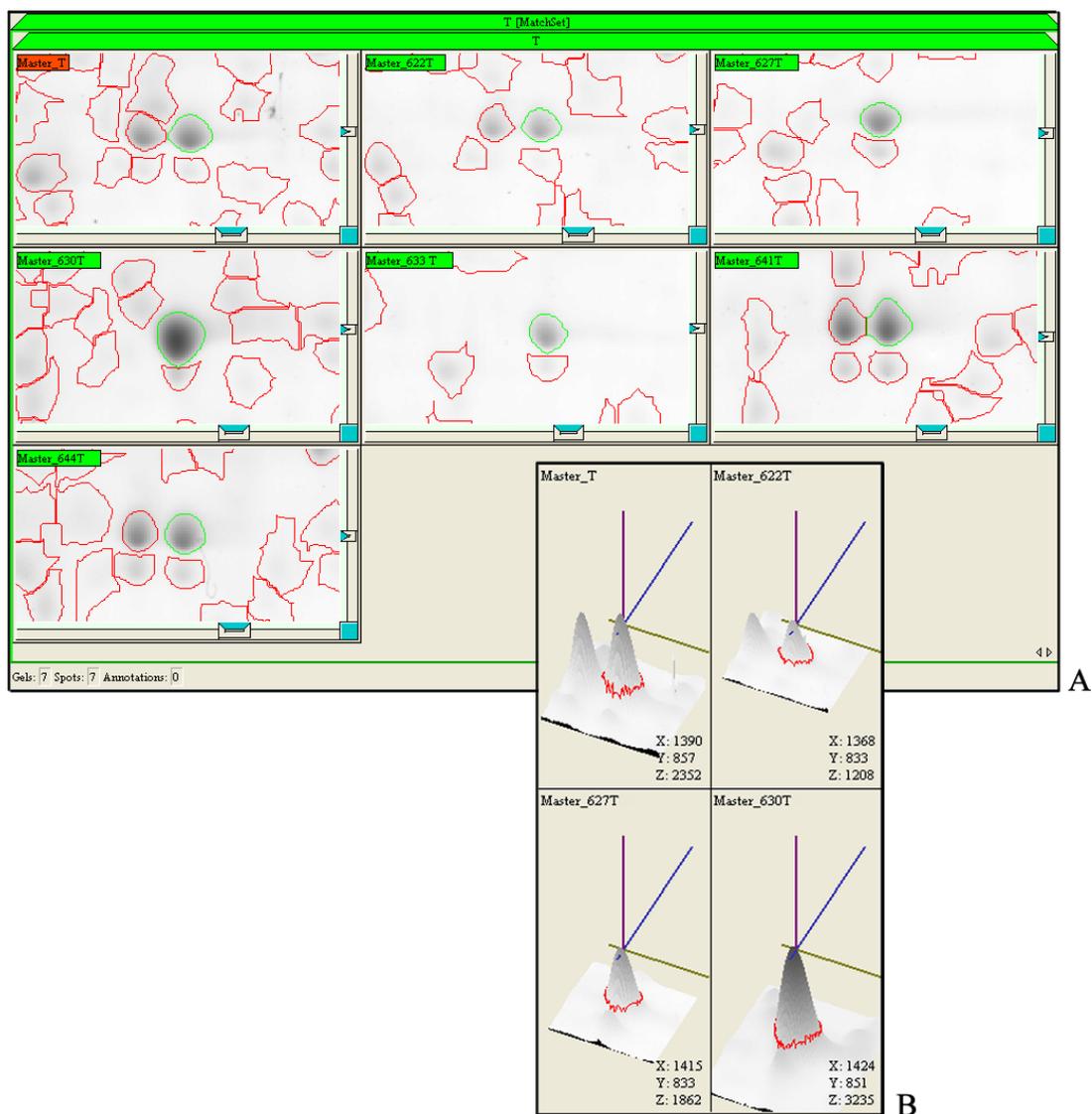


FIGURA 16 – IMAGENS DE REGIÕES DIFERENCIAIS OBSERVADA ENTRE AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. As bandas detectadas pelo programa *ImageMastertm* podem ser visualizadas quanto a diferenças de expressão e distribuição nos géis (A) e melhor avaliadas de acordo com a imagem tridimensional dos spots (B), representada pelas coordenadas x e y, referentes a área, e o eixo z correspondente ao volume. Neste caso, foram selecionadas as amostras CP 645T e CP 622T, com dois picos evidentes, CP 627T e CP 630T com apenas uma banda observada no local. FONTE: o autor (2011).

Como alternativa para identificar possíveis proteínas comuns envolvidas na tumorigênese e ainda variações entre indivíduos e diferentes tipos de tumores um novo projeto foi elaborado no programa *ImageMastertm*, também para minimizar interpretações subjetivas e, eventualmente, incorretas. Então, amostras pareadas, do linfonodo axilar e do tumor primário de cada paciente foram analisadas individualmente.

6.6 Amostras individualmente analisadas

6.6.1 Amostra CP 622

Inicialmente, a comparação entre linfonodo axilar e tumor primário de CP 622 mostrou 22 *spots* diferenciais entre os géis de referência das amostras CP 622L e CP 622T. Oito estavam presentes em linfonodos; sendo seis diferencialmente expressos e dois exclusivos dos linfonodos. Na amostra tumoral, sete correspondem à expressão aumentada e sete bandas foram exclusivas das amostras tumorais (TABELA 04). A análise estatística significativa variou ($0,05 > p > 0,02$ e $p < 0,001$) entre as bandas. Foram selecionados, no entanto, *spots* diferenciais com valor de $p < 0,02$ para refinar a estratégia de identificação e aumentar a confiabilidade (FIGURA 17).

TABELA 04 – CP 622: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 622L					
L.ID	T.ID	VD - CP 622L2	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i> <
1791	4046	2,218	3,759	3	0,05
1793	4054	2,398	2,916	4	0,05
1937	4191	2,171	8,513	4	0,01
2001		1000000	13,73	1	0,05
2062		1000000	47,53	1	0,02
2064	4309	2,227	5,737	4	0,01
2160	4425	2,074	4,147	4	0,02
2164	4426	2,364	9,404	4	0,001

CP 622T					
T.ID	L.ID	VD - CP 622T3	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i> <
3871	1583	2,338	7,083	4	0,01
3873	1588	2,676	16,41	4	0,001
3973		1000000	21,97	1	0,05
3992	1741	2,102	4,577	3	0,02

3998		1000000	17,54	1	0,05
4126	1870	2,607	8,813	4	0,001
4144	1888	3,697	3,641	4	0,05
4154	1903	3,959	6,701	4	0,01
4184		1000000	36,08	1	0,02
4247	1992	3,552	11,43	4	0,001
4337		1000000	13,28	1	0,05
4441		1000000	21,32	1	0,05
4447		1000000	19,84	1	0,05
4460		1000000	22,19	1	0,05

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de *p*.

FONTE: o autor (2011).

As bandas foram excisadas, digeridas e identificadas, sendo 14 diferentes proteínas em 12 *spots* com identificação positiva (TABELA 05). Em duas bandas não foi possível obter espectros com resolução suficiente para a análise. A presença de mais de uma proteína na mesma banda, como nesta situação, é provável em casos de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) muito próximos. Há também possibilidade de algumas proteínas migrarem associadas à outras e não atingirem o ponto final esperado, com MM e pI correspondentes.

Na amostra axilar, como resultado de bandas diferenciais (TABELA 05), foram encontradas: Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG); Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina gama, músculo liso (ACTH); Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA); Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19); e Peroxiredoxina 6 (PRDX6). Como banda presente no linfonodo e ausente no tumor, foi identificada a proteína Ubiquitina tioesterase (OTUB1). O gel do tumor primário apresentou diferença de expressão significativa nas bandas referentes à Serotransferrina (TRFE), Alfa-1 antitripsina (A1AT), Vimentina (VIME), Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1), Apolipoproteína A-I (APOA1). Apenas uma banda não foi identificada nesta amostra.

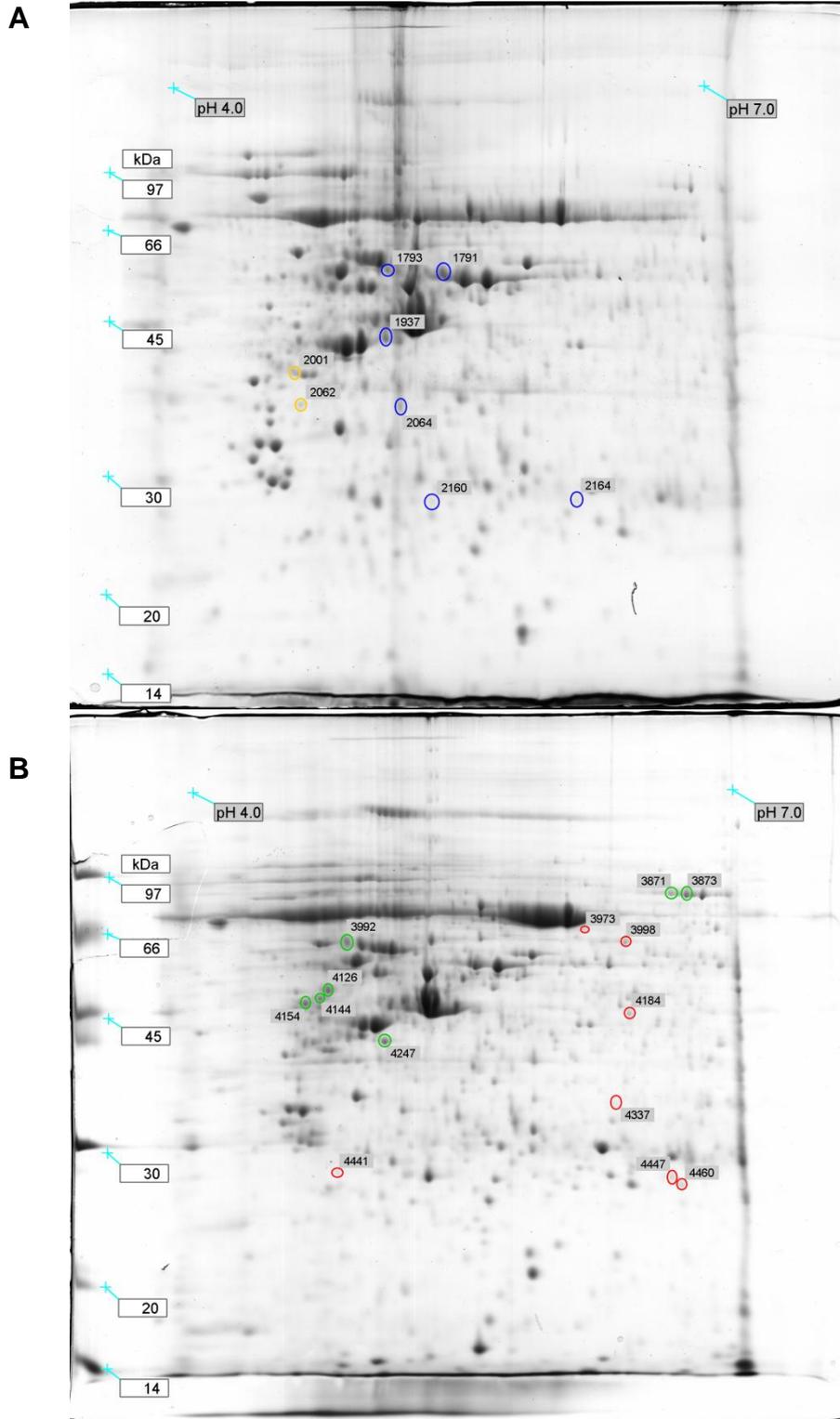


FIGURA 17: CP 622 - GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster[™]* estão destacadas em: **(A)** amarelo, presente apenas no linfonodo; azul, com aumento de expressão no linfonodo; **(B)** vermelho, apenas no tumor; e verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

TABELA 05 – CP 622: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 622L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
1937	Actina citoplasmática 1 (ACTB_HUMAN)	P60709	ACTB	7p22.1	42.05/5.29 43.00/5.18	116	28
	Actina citoplasmática 2 (ACTG_HUMAN)	P63261	ACTG1	17q25.3	42.11/5.31 43.00/5.18	116	28
	Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC_HUMAN)	P68032	ACTC1	15q14	42.33/5.23 43.00/5.18	77	19
	Actina alfa, músculo esquelético (ACTS_HUMAN)	P68133	ACTA1	1q42.13	42.36/5.23 43.00/5.18	76	19
	Actina gama, músculo liso (ACTH_HUMAN)	P63267	ACTG2	2p13.1	42.25/5.31 43.00/5.18	61	16
2062	Ubiquitina tioesterase (OTUB1_HUMAN)	Q96FW1	OTUB1	11q13.1	31.49/4.85 37.00/4.73	*33	*5
2064	Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA_HUMAN)	P54920	NAPA	19q13.32	33.67/5.23 36.00/5.26	163	44
2160	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 29.00/5.43	159	37
2164	Peroxiredoxina 6 (PRDX6_HUMAN)	P30041	PRDX6	1q25.1	25.23/6.00 29.00/6.22	56	72
CP 622T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
3871	Serotransferrina (TRFE_HUMAN)	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 86.00/6.65	108	40
3873	Serotransferrina (TRFE_HUMAN)	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 85.00/6.74	99	25
3992	Alfa-1 antitripsina (A1AT_HUMAN)	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37	88	19

4126	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	63.00/4.85 53.68/5.06 50.00/4.74	264	47
4154	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 47.00/4.61	97	58
	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 47.00/4.61	64	39
4184	-				- 45.00/6.42		
4247	Apolipoproteína A-I (APOA1_HUMAN)	P02647	APOA1	11q23.3	30.76/5.56 41.00/5.06	108	41

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; *Identificação através de MS/MS, onde score e cobertura não seguem valores dos parâmetros considerados; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

6.6.2 Amostra CP 627

Na comparação interclasse (linfonodo axilar *versus* tumor primário) da paciente CP 627 observou-se 20 *spots* diferenciais entre os géis de referência do linfonodo axilar (13) e do tumor primário (7) (TABELA 06). Dez estavam presentes apenas nos linfonodos axilares e 10 diferencialmente expressos entre as amostras. A análise estatística apresentou valores de significância entre as bandas entre 0,05 e 0,001, entretanto apenas as bandas com valor de $p < 0,02$ foram submetidas a identificação.

De 12 bandas excisadas, nove apresentaram identificação positiva na amostra CP 627 (FIGURA 18) (TABELA 07). São elas: Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19); Metionil-tRNA formiltransferase, mitocondrial (FMT); Glutamina S-transferase P (GSTP1), mais expressas no linfonodo; Queratina do citoesqueleto 10, tipo I (K1C10), Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1), como bandas exclusivas de CP 627L. Serotransferrina (TRFE), Alfa-1 antitripsina (A1AT), Vimentina (VIME), foram mais expressas no tumor. Em duas bandas não foi possível obter espectros significativos para a análise. Duas proteínas não mostraram resultados significativos para a identificação.

TABELA 06 – CP 627: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 627L					
L.ID	T.ID	VD - CP 627L1	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i> <
3134		1000000	12,89	1	0,05
3224		1000000	13,14	1	0,05
3366	2582	3,021	9,469	4	0,001
3380		1000000	22,98	1	0,05
3519		1000000	45,38	1	0,02
3534		1000000	33,17	1	0,02
3555		1000000	15,84	1	0,05
3673	2732	2,234	5,689	3	0,02
3682		1000000	17,89	1	0,05

3795		1000000	14,23	1	0,05
3706		1000000	14,76	1	0,05
3812	2822	2,933	21,67	4	0,001
3813		1000000	43,02	1	0,02

CP 627T

T.ID	L.ID	VD - CP 627T1	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i><
2257	2776	4,608	13,24	4	0,001
2258	2783	2,846	8,332	4	0,01
2470	3159	2,834	11,45	4	0,001
2514	3268	2,060	3,294	3	0,05
2592	3385	2,858	11,18	4	0,001
2601	3395	3,889	30,69	4	0,001
2622	3462	2,635	4,414	3	0,05

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de ***p***.

FONTE: o autor (2011).

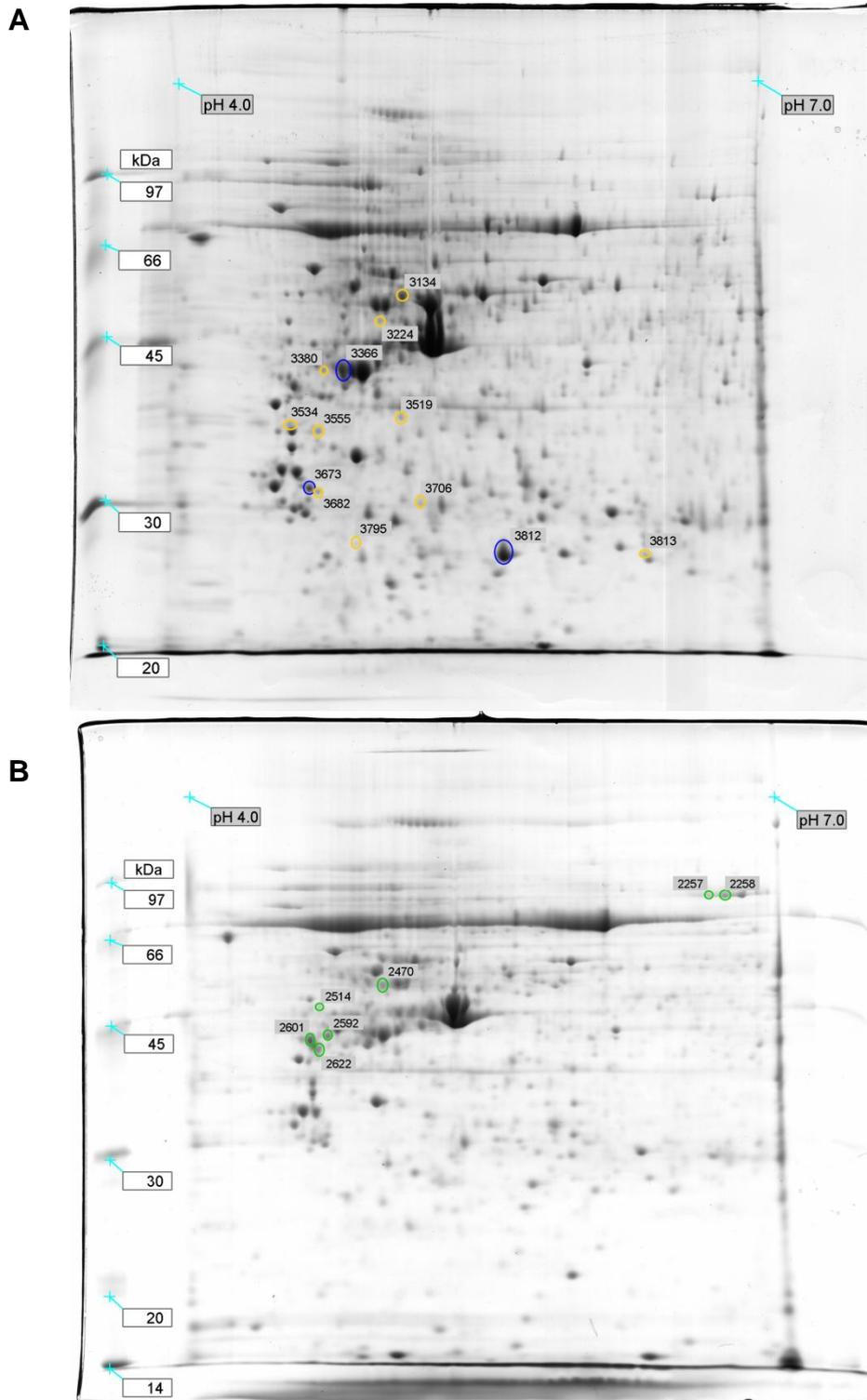


FIGURA 18 – CP 627: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster™* estão destacadas em: **(A)** amarelo, presente apenas no linfonodo; azul, com aumento de expressão no linfonodo; e **(B)** verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

TABELA 07 – CP 627: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 627L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
3366	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 42.00/4.81	289	60
3519	-	-	-	-	- 38.00/5.13	-	-
3534	Queratina do citoesqueleto 10, tipo I (K1C10_HUMAN)	P13645	KRT10	17q21.2	59.02/5.13 37.00/4.53	67	44
	Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1_HUMAN)	P09493	TPM1	15q22.2	32.75/4.69 37.00/4.53	63	73
3673	Metionil-tRNA formil-transferase, mitocondrial (FMT_HUMAN)	Q96DP5	MTFMT	15.q22.31	44.20/9.70 31.00/4.64	59	50
3812	Glutaciona S-transferase P (GSTP1_HUMAN)	P09211	GSTP1	11q13.2	23.57/5.43 25.00/5.67	127	57
3813	-	-	-	-	- 26.00/6.42	-	-
CP 627T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
2257	Serotransferrina (TRFE_HUMAN)	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 87.00/6.64	57	39
2258	Serotransferrina (TRFE_HUMAN)	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 87.00/6.73	169	22
2470	Alfa-1 antitripsina (A1AT_HUMAN)	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 53.00/4.96	155	32
	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 53.00/4.96	113	27
2592	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 43.00/4.68	187	33
2601	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 43.00/4.59	310	49

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada. FONTE: o autor (2011).

6.6.3 Amostra CP 630

A análise comparativa da amostra CP 630 apresentou 31 *spots* diferenciais entre os géis de referência do linfonodo axilar (17) e do tumor primário (14) (TABELA 08). Apenas três *spots* foram exclusivos da amostra de linfonodo axilar, enquanto 14 estavam mais expressos. No tumor primário, sete estavam presentes somente na amostra tumoral e sete mostraram expressão aumentada (FIGURA 19). As bandas com valor de $p < 0,02$ foram submetidas a identificação.

TABELA 08 – CP 630: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 630L					
L.ID	T.ID	VD - CP 630L2	Teste t	GL	p<
2467	3644	3,027	12,63	4	0,001
2471		1000000	13,91	1	0,05
2486	3696	3,404	4,247	4	0,02
2519	3673	2,275	6,712	4	0,01
2521	3665	3,262	6,808	4	0,01
2524	3663	4,284	21,74	4	0,001
2526	3661	2,401	6,349	3	0,01
2592		1000000	28,99	1	0,05
2599		1000000	34,22	1	0,02
2661	3775	2,545	3,385	4	0,05
2674	3810	6,036	11,53	2	0,01
2677	3814	3,824	16,81	4	0,001
2690	3824	2,393	12,12	4	0,001
2710	3851	3,159	22,06	4	0,001
2901	4093	3,113	10,04	4	0,001
2961	4189	3,172	9,831	4	0,001
2967	4175	2,471	11,39	4	0,001
CP 630T					
T.ID	L.ID	VD - CP 630T2	Teste t	GL	p<
3525		1000000	23,67	1	0,05

3553	2342	2,561	4,278	4	0,02
3565		1000000	21,78	1	0,05
3652	2472	3,887	9,093	4	0,001
3725		1000000	42,17	1	0,02
3748		1000000	16,77	1	0,05
3758	2627	11,850	39,94	4	0,001
3845		1000000	18,22	1	0,05
3974	2773	4,765	6,093	2	0,05
4061	2856	2,593	4,675	3	0,02
4146		1000000	25,38	1	0,05
4155		1000000	36,08	1	0,02
4232	3000	3,704	7,530	2	0,02
4243	3014	2,438	9,973	4	0,001

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de **p**.
 FONTE: o autor (2011).

Dentre as 14 bandas excisadas com expressão aumentada no linfonodo axilar, estão incluídas as proteínas identificadas como Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8), Vimentina (VIME), Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1), Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19) e Interleucina 6 (IL6). As proteínas Vimentina (VIME) foram identificadas em bandas exclusivas de tumor primário, enquanto Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8), Vimentina (VIME), Ferritina, cadeia leve (FRIL) e Catepsina (CATD) estavam mais expressas neste mesmo tecido (TABELA 09). Seis *spots* não apresentaram identificação positiva dentro dos parâmetros avaliados.

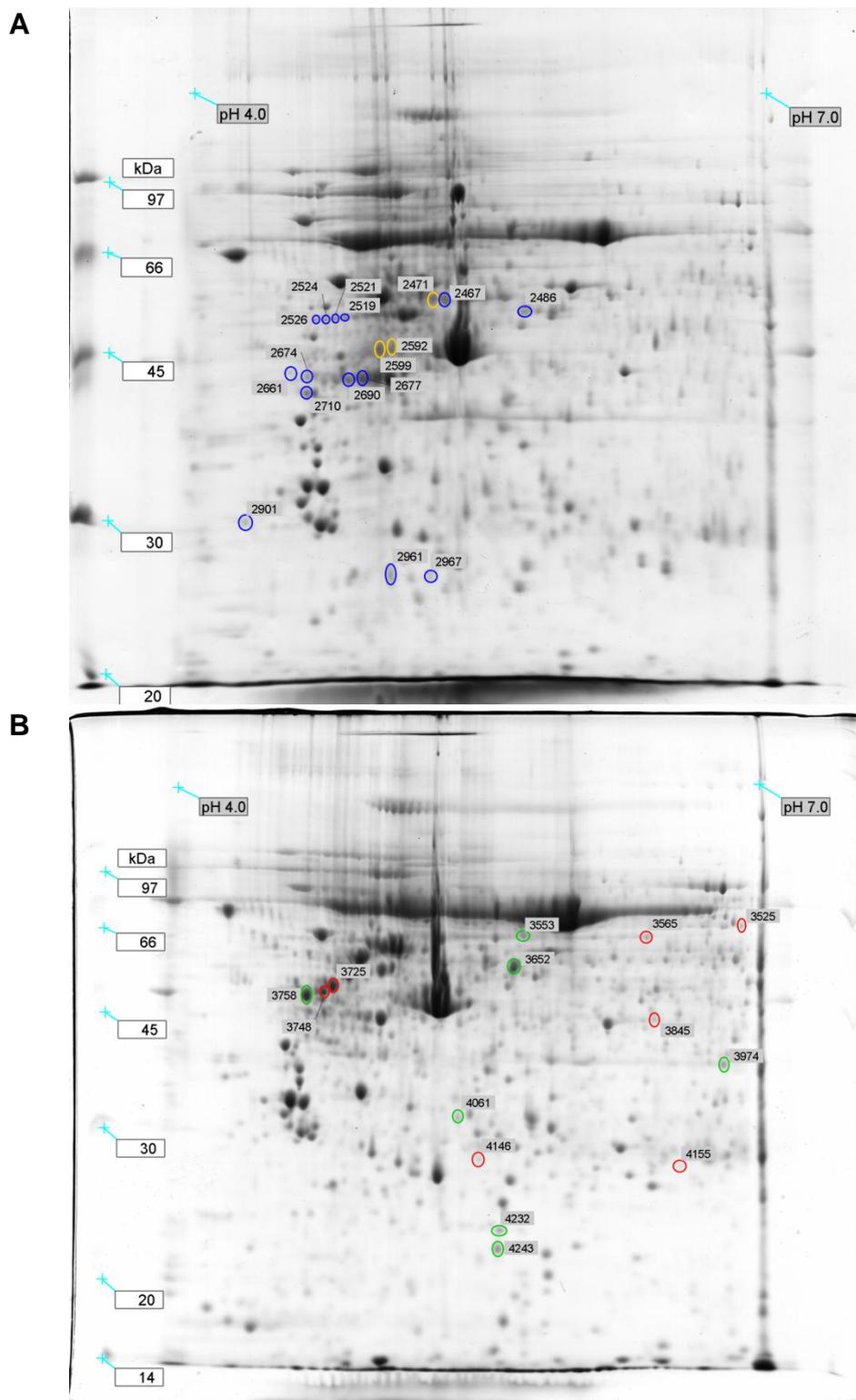


FIGURA 19 – CP 630: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster™* estão destacadas em: **(A)** amarelo, presente apenas no linfonodo; azul, com aumento de expressão no linfonodo; **(B)** vermelho, apenas no tumor; e verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

TABELA 09 – CP 630: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 630L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
2467	Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8_HUMAN)	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 56.00/5.29	59	66
2486	-				- 54.00/5.73		
2519	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 53.00/4.75	59	15
2521	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 52.00/4.69	77	18
2524	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 52.00/4.64	56	48
2526	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 52.00/4.59	70	16
2599	-				- 47.00/4.94		
2674	-				- 43.00/4.54		
2677	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 43.00/4.84	163	61
2690	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 43.00/4.77	121	54
2710	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 42.00/4.54	74	33
2901	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 30.00/4.20	102	11
2961	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 26.00/5.00	86	19

2967	Interleucina 6 (IL6_HUMAN)	P05231	IL6	7p15.3	23.93/6.17 26.00/5.21	57	54
CP 630T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pi ^c esp. MM/pi obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
3553	-				- 57.00/5.81		
3652	Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8_HUMAN)	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 50.00/5.76	73	67
3725	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 46.00/4.86	165	62
3758	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 45.00/4.73	61	34
4061	Catepsina D (CATD_HUMAN)	P07339	CTSD	11p15.5	45.04/6.10 30.00/4.48	62	42
4155	-				- 27.00/6.59		
4232	-				- 23.00/5.69		
4243	Ferritina, cadeia leve (FRIL_HUMAN)	P02792	FTL	19q13.33	20.06/5.51 22.00/5.68	63	36

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

6.6.4 Amostra CP 633

A análise comparativa da amostra CP 633 apresentou 14 *spots* relevantes. Duas bandas estavam presentes apenas em linfonodos axilares, e uma delas com expressão aumentada em relação aos tumores primários. Duas bandas eram exclusivas e nove com aumento de expressão nas amostras de tumores primários (FIGURA 20). O valor de $p < 0,02$ sugeriu a análise de nove bandas (TABELA 10).

TABELA 10 – CP 633: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 633L					
L.ID	T.ID	VD - CP 633L2	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i> <
4598		1000000	16,87	1	0,05
4675		1000000	13,56	1	0,05
5086	6204	2,088	5,081	3	0,02
CP 633T					
T.ID	L.ID	VD - CP 633T1	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i> <
6060	4879	4,161	10,31	3	0,01
6061	4870	2,498	7,104	4	0,01
6064	4876	2,279	6,164	4	0,01
6066	4881	2,595	6,863	4	0,01
6080		1000000	37,69	1	0,02
6191	5075	3,425	15,33	4	0,001
6194	5083	2,446	6,208	3	0,01
6227	5109	2,057	3,738	3	0,05
6242	5099	3,642	5,644	2	0,05
6266		1000000	14,71	1	0,05
6343	5222	2,255	8,423	4	0,01

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastersm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de ***p***.

FONTE: o autor (2011).

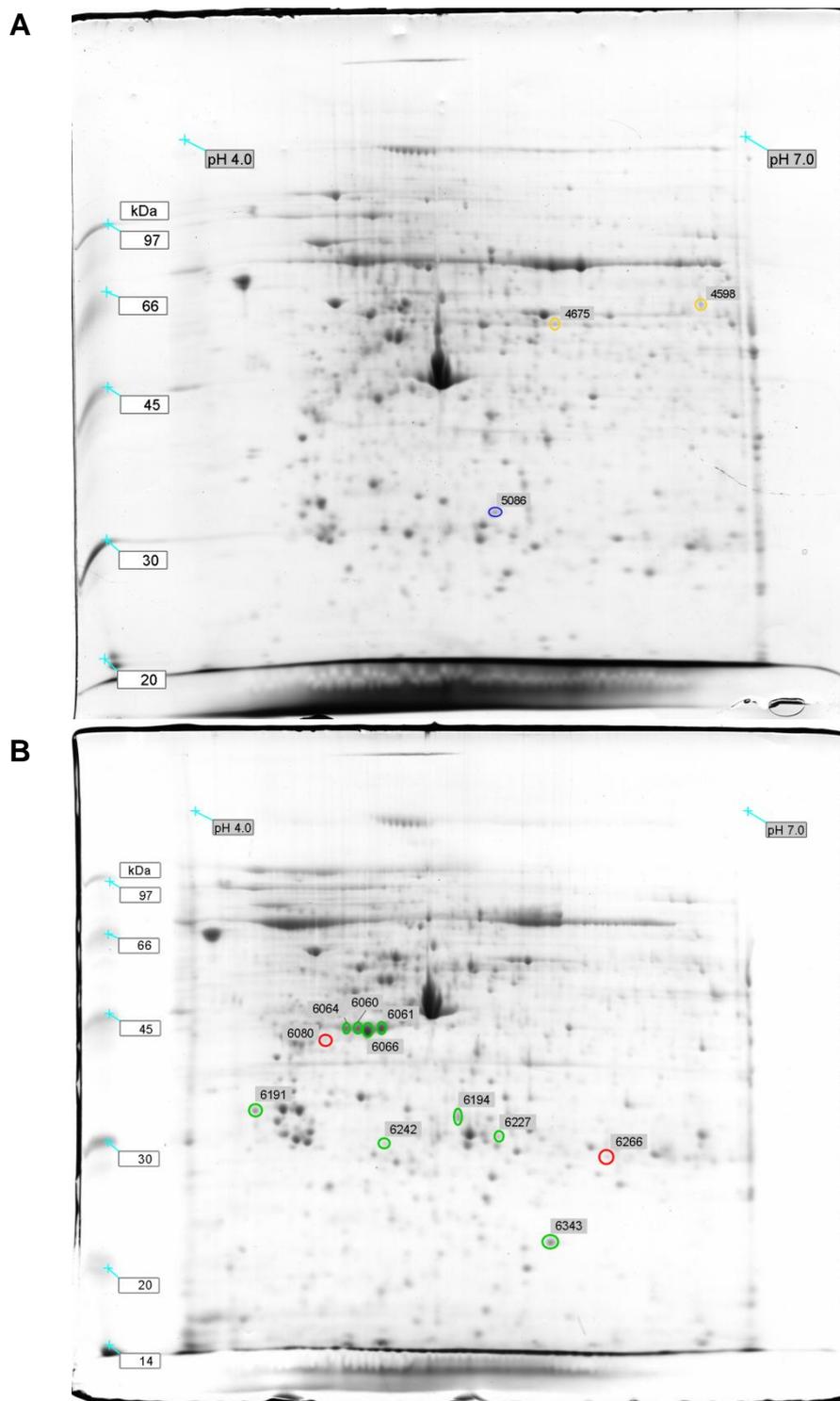


FIGURA 20 – CP 633: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster™* estão destacadas em: **(A)** amarelo, presente apenas no linfonodo; azul, com aumento expressão no linfonodo; **(B)** vermelho, apenas no tumor; e verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

TABELA 11 – CP 633: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 633L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso <i>SwissProt</i> ^a	Gene <i>UniGene</i> ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
5086	Queratina do citoesqueleto 16, tipo I (K1C16_HUMAN)	P08779	KRT16	17q21.2	51.58/4.99 33.00/5.55	128	28
	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 33.00/5.55	88	25
	Queratina do citoesqueleto 3, tipo II (K2C3_HUMAN)	P12035	KRT3	12q13.13	64.55/6.12 33.00/5.55	56	16
CP 633T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso <i>SwissProt</i> ^a	Gene <i>UniGene</i> ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
6060	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 44.00/4.91	252	51
	Queratina do citoesqueleto 3, tipo II (K2C3_HUMAN)	P12035	KRT3	12q13.13	64.55/6.12 44.00/4.91	58	14
6061	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 44.00/5.04	250	47
6064	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 44.00/4.85	195	41
6066	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 43.00/4.97	283	45
6080	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 42.00/4.74	89	20
6191	-				- 33.00/4.37		
6194	Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2_HUMAN)	Q9UL46	PSME2	14q12	27.55/5.54 33.00/5.45	56	60

6343	Nucleosídeo difosfato quinase A (NDKA_HUMAN)	P15531	NME1	17q21.33	17.31/5.83 22.00/5.94	110	51
------	---	--------	------	----------	--------------------------	-----	----

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d *Score* obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

A única banda (5086) significativa observada na amostra de linfonodo axilar apresentou aumento de expressão e corresponde as proteínas Queratina do citoesqueleto 16, tipo I (K1C16), Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1 e Queratina do citoesqueleto 3, tipo II (K2C3). Um *spot* correspondente a proteína Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19) foi observado no tumor primário. As bandas com expressão aumentada entre tumores primários se referem às proteínas Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19), Queratina do citoesqueleto 3, tipo II (K2C3), Complexo ativador do proteossoma - subunidade 2 (PSME2) e Nucleosídeo difosfato quinase A (NDKA). Apenas um *spot* não mostrou resultado positivo na identificação (TABELA 11).

6.6.5 Amostra CP 641

A amostra CP 641 apresentou 37 bandas distintas. No linfonodo axilar, todas as bandas (18) apresentaram expressão protéica aumentada. No tumor, sete eram exclusivas do mesmo e 12 bandas apresentaram aumento de expressão no tumor primário, comparado ao linfonodo (FIGURA 21). Seis *spots* foram excluídos da seleção de identificação por apresentar valor de p maior que 0,02 (TABELA 12).

TABELA 12 – CP 641: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 641L					
L.ID	T.ID	VD - CP 641L3	Teste t	GL	$p <$
1940	1880	4,963	12,79	3	0,01
1941	1881	2,362	4,419	3	0,05
2053	1994	2,142	4,999	3	0,02
2058	1996	8,469	8,347	4	0,01
2074	2021	2,299	8,119	4	0,01
2085	2030	2,609	7,439	4	0,01
2092	2035	2,457	4,686	4	0,01
2093	2040	2,265	12,39	4	0,001
2129	2077	2,641	7,039	4	0,01

2172	2112	3,179	11,68	4	0,001
2176	2121	11,226	11,26	2	0,01
2249	2190	7,510	28,08	4	0,001
2250	2189	2,432	5,315	4	0,01
2272	2219	2,022	6,390	4	0,01
2273	2220	2,009	6,549	4	0,01
2433	2414	2,248	9,699	4	0,001
2483	2534	2,016	4,961	4	0,01
2491	2545	3,837	5,812	4	0,01

CP 641T

T.ID	L.ID	VD - CP 641T3	Teste t	GL	p<
2027		1000000	17,87	1	0,05
2037		1000000	28,59	1	0,05
2084	2139	4,889	11,14	3	0,01
2159		1000000	20,46	1	0,05
2184	2227	4,837	7,025	2	0,02
2197	2236	2,514	8,777	4	0,001
2223	2267	2,449	4,671	4	0,01
2240	2276	5,301	5,125	3	0,02
2251		1000000	29,34	1	0,05
2254		1000000	18,32	1	0,05
2292		1000000	34,31	1	0,02
2312	2358	13,105	13,87	4	0,001
2370	2400	9,882	15,57	2	0,01
2434	2453	5,573	12,56	3	0,01
2451	2463	2,852	8,406	4	0,01
2493	2481	7,085	14,85	2	0,01
2526		1000000	32,22	1	0,02
2537	2482	4,765	11,20	3	0,01
2543	2518	2,942	16,90	4	0,001

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de **p**.
 FONTE: o autor (2011).

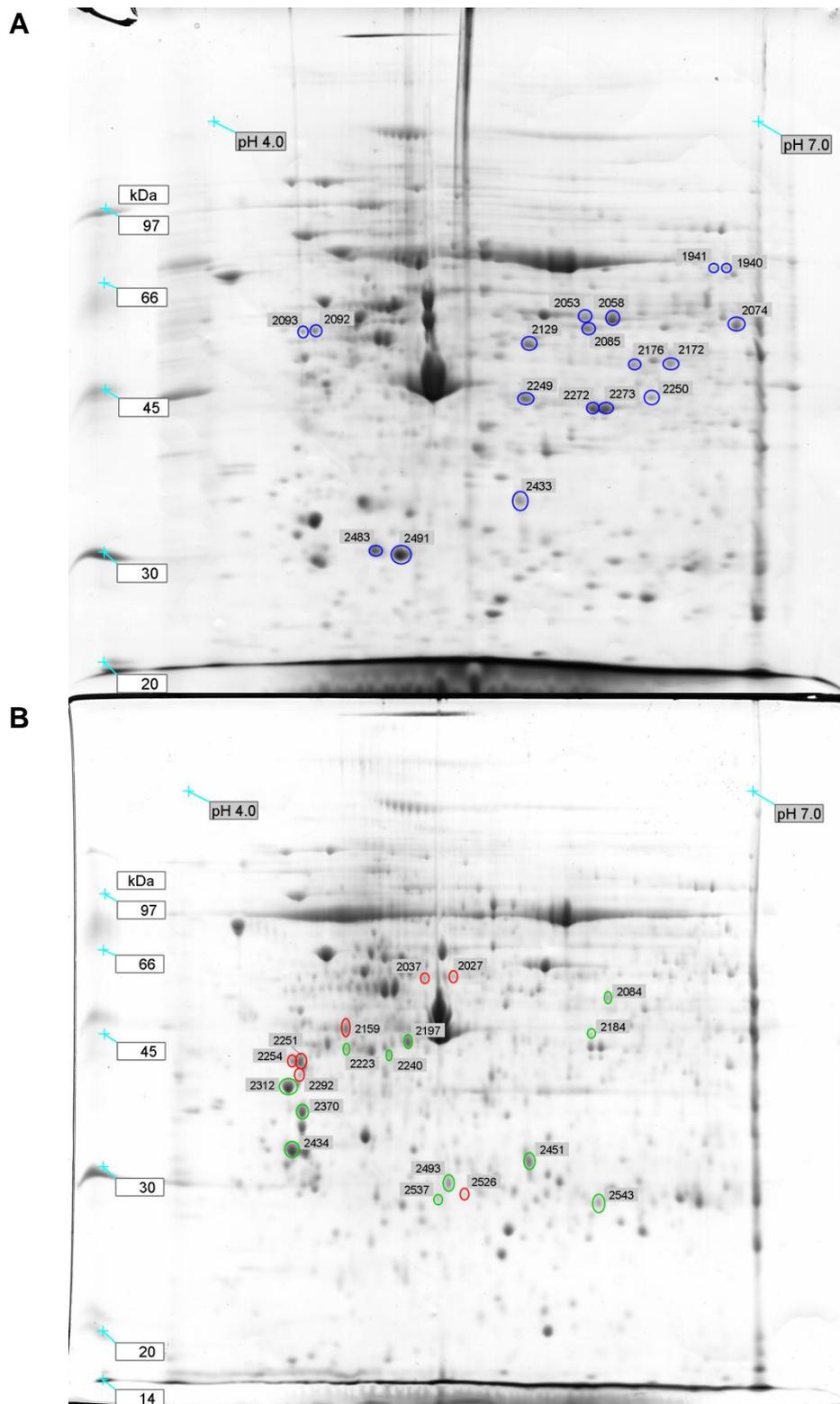


FIGURA 21 – CP 641: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster™* estão destacadas em: **(A)** amarelo, presente apenas no linfonodo; azul, com aumento de expressão no linfonodo; **(B)** vermelho, apenas no tumor; e verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

TABELA 13 – CP 641: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 641L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
1940	-				- 77.00/6.83		
2053	-				- 63.00/6.03		
2058	-				- 62.00/6.18		
2074	Aminopeptidase citosólica (AMPL_HUMAN)	P28838	LAP3	4p15.32	56.53/8.03 61.00/6.89	126	33
2085	Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2_HUMAN)	P05091	ALDH2	12q24.12	56.86/6.63 60.00/6.04	117	21
2092	Poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG_HUMAN)	Q86W56	PARG	10q11.23	11.25/6.03 59.00/4.49	62	46
2093	-				- 59.00/4.42		
2129	Proteína 3 relacionada a actina (ARP3_HUMAN)	P61158	ACTR3	2q14.1	47.78/5.61 56.00/5.71	179	39
2172	-				- 52.00/6.52		
2176	Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6_HUMAN)	Q96JE9	MAP6	11q13.5	86.68/9.20 51.00/6.31	81	50
2249	Serpina B9 (SPB9_HUMAN)	P50453	SERPINB9	6p25.2	43.00/5.61 45.00/5.69	201	43
2250	-				- 45.00/6.41		
2272	Proteína ligante de macrófago (CAPG_HUMAN)	P40121	CAPG	2p11.2	38.76/5.82 43.00/6.08	*62	*3
2273	-				- 43.00/6.14		
2433	Proteína de nivelamento F-actina subunidade	P47756	CAPZB	1p36.13	31.62/5.36	112	31

	beta (CAPZB_HUMAN)				35.00/5.66		
2483	Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1_HUMAN)	P52565	ARHGDIS	17q25.3	23.25/5.02 31.00/4.83	75	25
2491	Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2_HUMAN)	P52566	ARHGDI2	12p12.3	23.03/5.10 30.00/4.97	82	57
CP 641T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
2084	-				- 49.00/6.22		
2184	-				- 43.00/6.13		
2197	Actina citoplasmática 1 (ACTB_HUMAN)	P60709	ACTB	7p22.1	42.05/5.29 42.00/5.11	138	30
	Actina citoplasmática 2 (ACTG_HUMAN)	P63261	ACTG1	17q25.3	42.11/5.31 42.00/5.11	138	30
	Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC_HUMAN)	P68032	ACTC1	15q14	42.33/5.23 42.00/5.11	96	21
	Actina alfa, músculo esquelético (ACTS_HUMAN)	P68133	ACTA1	1q42.13	42.36/5.23 42.00/5.11	95	21
	Actina gama, músculo liso (ACTH_HUMAN)	P63267	ACTG2	2p13.1	42.25/5.31 42.00/5.11	78	18
2223	Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19_HUMAN)	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 42.00/4.76	78	29
2240	Zinco-alfa-2-glicoproteína (ZA2G_HUMAN)	P25311	AZGP1	7q22.1	34.46/5.71 41.00/5.00	115	25
2292	-				- 39.00/4.51		
2312	Tropomiosina cadeia beta (TPM2_HUMAN)	P07951	TPM2	9p13.3	32.95/4.66 38.00/4.44	116	25
	Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4_HUMAN)	P67936	TPM4	19p13.12	28.62/4.67 38.00/4.44	60	16
2370	Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1_HUMAN)	P09493	TPM1	15q22.2	32.75/4.69 35.00/4.52	112	34

	Tropomiosina cadeia beta (TPM2_HUMAN)	P07951	TPM2	9p13.3	32.95/4.66 35.00/4.52	73	29
	Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3_HUMAN)	P06753	TPM3	1q21.3	32.86/4.68 35.00/4.52	58	23
2434	Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4_HUMAN)	P67936	TPM4	19p13.12	28.62/4.67 32.00/4.46	168	47
2451	Catepsina D (CATD_HUMAN)	P07339	CTSD	11p15.5	45.04/6.10 31.00/5.78	138	24
2493	-				- 30.00/5.34		
2526	-				- 29.00/5.42		
2537	-				- 28.00/5.28		
2543	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF_HUMAN)	O14727	APAF1	12q23.1	14.41/5.96 28.00/6.16	*7	*1

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d *Score* obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; *Identificação através de MS/MS, onde *score* e cobertura não seguem valores dos parâmetros considerados; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

No total, 17 bandas foram removidas do gel referente à amostra CP 641L e submetidas à identificação. As proteínas com expressão aumentada no linfonodo axilar foram: Aminopeptidase citosólica (AMPL), Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2), Poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG), Proteína 3 relacionada a actina (ARP3), Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6), Serpina B9 (SPB9), Proteína ligante de macrófago (CAPG), Proteína de nivelamento F-actina subunidade beta (CAPZB), Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1) e Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIA2). Sete *spots* do linfonodo não foram identificados por espectrometria de massa (TABELA 13).

Dentre as 14 bandas excisadas de CP 641T a Actina citoplasmática 1 (ACTB), Actina citoplasmática 2 (ACTG), Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC), Actina alfa, músculo esquelético (ACTS), Actina gama, músculo liso (ACTH), Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19), Zinco-alfa-2-glicoproteína (ZA2G), Tropomiosina cadeia beta (TPM2), Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4), Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1), Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3), Catepsina D (CATD) e Fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF), correspondem a proteínas com expressão aumentada no tumor primário. Seis bandas não apresentaram identificação protéica positiva, ou *score* acima de 56% (TABELA 13).

6.6.6 Amostra CP 644

A amostra CP 644 mostrou um total de 33 bandas diferenciais (FIGURA 22). Dessas, 10 apresentaram expressão aumentada no linfonodo axilar. Em outras 23 bandas identificadas no tumor primário, seis foram observadas somente neste tumor e 17 apresentaram um valor de expressão aumentada no tumor, comparado ao linfonodo correspondente. Foram selecionados 22 *spots* com $p < 0,02$ para identificação por espectrometria de massas (TABELA 14).

TABELA 14 – CP 644: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 644L					
L.ID	T.ID	VD - CP 644L3	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i><
2505	3405	4,314	2,927	4	0,05
2521	3436	2,065	5,274	3	0,01
2529	3438	2,239	5,229	3	0,02
2552	3475	2,542	14,66	4	0,001
2621	3526	3,257	6,286	4	0,01
2714	3617	5,688	12,55	4	0,001
2774	3692	4,518	14,21	4	0,001
2781	3699	2,082	5,328	4	0,01
3004	3959	2,352	11,38	4	0,001
3022	3972	2,198	5,604	4	0,01
CP 644T					
T.ID	L.ID	VD - CP 644T2	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i><
3395	2469	2,598	6,070	3	0,01
3408		1000000	21,79	1	0,05
3608	2712	2,471	6,419	3	0,01
3643		1000000	30,04	1	0,05
3653		1000000	30,69	1	0,05
3674		1000000	17,51	1	0,05
3679		1000000	20,06	1	0,05
3730	2832	2,172	4,387	2	0,05
3735	2780	2,803	5,938	2	0,05
3814	2885	4,807	8,688	2	0,02
3847	2931	5,555	11,67	2	0,01
3850	2917	3,569	7,168	2	0,02
3881	2948	2,411	6,296	3	0,01
3883	2952	3,799	9,053	3	0,01
3885		1000000	14,43	1	0,05
3887	2959	6,127	4,424	2	0,05
3901	2969	3,836	8,927	3	0,01
3902	2963	2,251	5,728	3	0,02
3909	2972	3,437	6,323	2	0,05

3913	2970	4,136	7,202	2	0,02
3917	2984	3,326	7,675	3	0,01
3924	2974	4,542	9,707	2	0,02
4016	3049	2,125	5,309	3	0,02

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de **p**.

FONTE: o autor (2011).

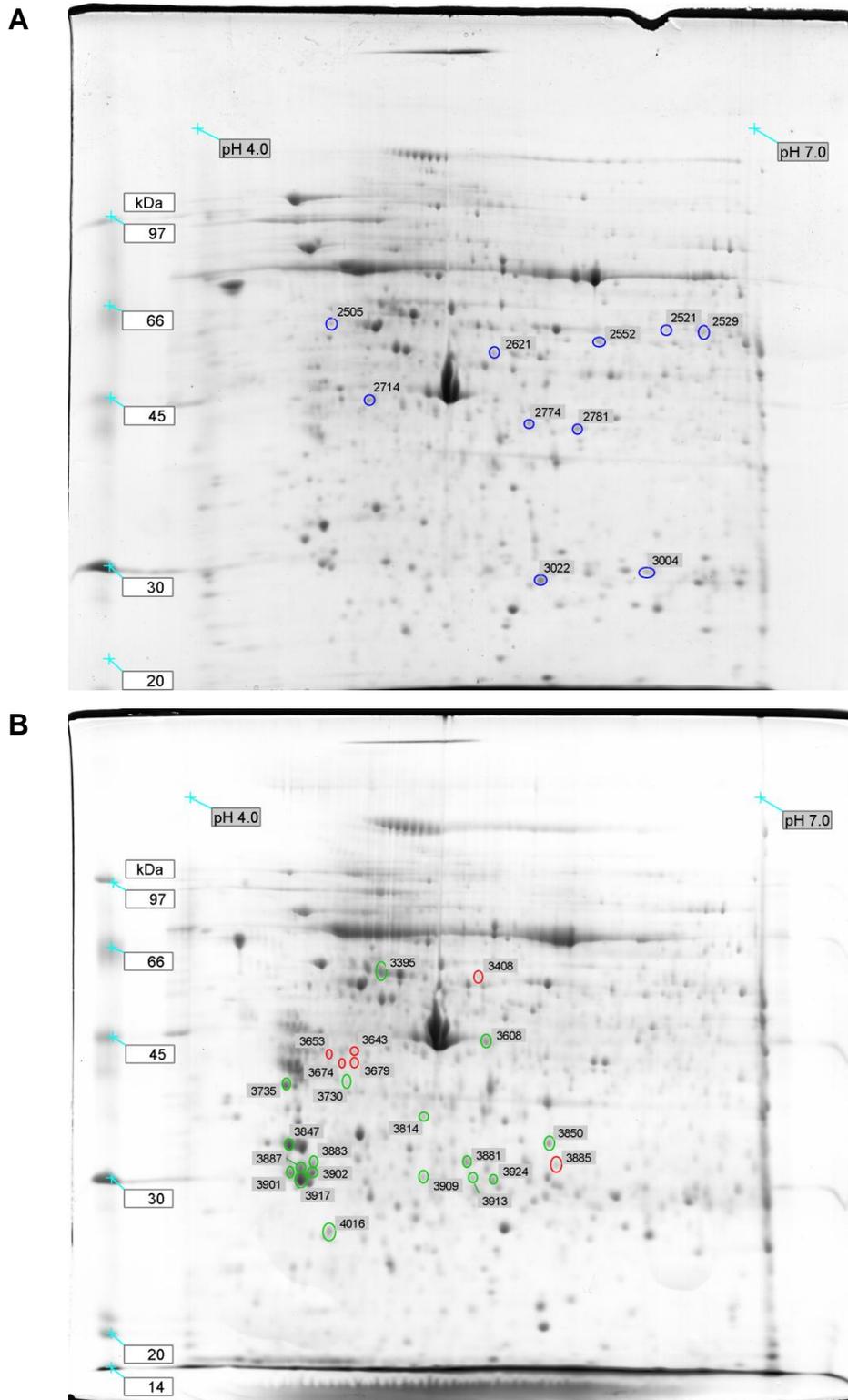


FIGURA 22 – CP 644: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster™* estão destacadas em: **(A)** azul, com aumento de expressão no linfonodo; **(B)** vermelho, apenas no tumor; e verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

As proteínas com aumento de expressão no linfonodo axilar identificadas são: Proteína de processamento do RNA ribossomal 1, homolog. A (RRP1); Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2); Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1); Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB); Cadeia 2 Ig lambda, região C (LAC2); e Peroxiredosina 4 (PRDX4). As proteínas que apresentaram elevada expressão no tumor primário de mama foram: Alfa-1 antitripsina (A1AT); Creatina quinase tipo B (KCRB); Proteína glial fibrilar ácida (GFAP); Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4); Tropomiosina cadeia beta (TPM2); Anexina A4 (ANXA4); Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2); Proteína 14-3-3 teta (1433T); Proteína 14-3-3 gama (1433G); Proteína zeta/delta (1433Z); Queratina do citoesqueleto 9, tipo I (K1C9); Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1). Quatro bandas não apresentaram resultado significativo na identificação (TABELA 15).

TABELA 15 – CP 644: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 644L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
2521	-				-		
2529	Proteína de processamento do RNA ribossomal 1, homolog. A (RRP1_HUMAN)	P56182	RRP1	21q22.3	56.00/6.49 53.04/9.39 56.00/6.71	56	39
2552	Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2_HUMAN)	P05091	ALDH2	12q24.12	56.86/6.63 54.00/6.12	58	53
2621	-				-		
2714	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	50.00/5.48 66.17/8.15 45.00/4.83	56	31
2774	Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB_HUMAN)	P02675	FGB	4q31.3	56.58/8.54 42.00/5.73	124	59
2781	Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB_HUMAN)	P02675	FGB	4q31.3	56.58/8.54 42.00/5.99	80	49
3004	Cadeia 2 Ig lambda, região C (LAC2_HUMAN)	P0CG05	IGLC2	22q11.2	11.46/6.92 30.00/6.39	61	46
3022	Peroxiredosina 4 (PRDX4_HUMAN)	Q13162	PRDX4	Xp22.11	30.75/5.86 29.00/5.79	149	40
CP 644T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
3395	Alfa-1 antitripsina (A1AT_HUMAN)	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 59.00/4.94	78	16
3608	Creatina quinase tipo B (KCRB_HUMAN)	P12277	CKB	14q32.32	42.90/5.34 45.00/5.52	91	26
3814	Proteína glial fibrilar ácida (GFAP_HUMAN)	P14136	GFAP	17q21.31	49.91/5.42 36.00/5.18	*58	*2
3847	Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4_HUMAN)	P67936	TPM4	19p13.12	28.62/4.67 33.00/4.45	168	47
	Tropomiosina cadeia beta (TPM2_HUMAN)	P07951	TPM2	9p13.3	32.94/4.66 33.00/4.45	66	24

3850	Anexina A4 (ANXA4_HUMAN)	P09525	ANXA4	2p13.3	36,10/5,84 33.00/5.86	110	26
3881	Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2_HUMAN)	Q9UL46	PSME2	14q12	27.50/ 5.44 32.00/ 5.41	69	21
3883	-				-		
3901	Proteína 14-3-3 teta (1433T_HUMAN)	P27348	YWHAQ	2p25.1	32.00/4.58 28.03/4.68 31.00/4.46	80	27
3902	Proteína 14-3-3 gama (1433G_HUMAN)	P61981	YWHAG	7q11.23	28.40/4.80 31.00/4.58	87	35
3913	-				-		
3917	Proteína zeta/delta (1433Z_HUMAN)	P63104	YWHAZ	8q22.3	30.00/5.44 27.90/4.73 30.00/4.51	187	52
3924	Queratina do citoesqueleto 9, tipo I (K1C9_HUMAN)	P35527	KRT9	17q21.2	62.25/5.14 30.00/5.55	87	22
	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 30.00/5.55	82	15
4016	Queratina do citoesqueleto 9, tipo I (K1C9_HUMAN)	P35527	KRT9	17q21.2	62.25/5.14 26.00/4.67	74	25
	Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1_HUMAN)	P04264	KRT1	12q13.13	66.17/8.15 26.00/4.67	74	24

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação à seqüência completa da proteína, em porcentagem; *Identificação através de MS/MS, onde score e cobertura não seguem valores dos parâmetros considerados; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

6.6.7 Amostra CP 645

A amostra CP 645 apresentou o maior número de bandas diferenciais, sendo 55 no total (FIGURA 23). Em 28 *spots* observados no linfonodo axilar, apenas cinco foram exclusivos de CP 645L e outros 23 sugerem expressão aumentada neste linfonodo. No tumor primário, entre 27 bandas distintas, 11 foram observadas somente no tumor, enquanto 16 mostraram aumento na expressão (TABELA 16). Foram selecionados 47 *spots* para identificação, com valor de $p < 0,02$.

TABELA 16 – CP 645: SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 645L					
L.ID	T.ID	VD - CP 645L3	Teste t	GL	p<
2605	2922	2,968	10,79	4	0,001
2631		1000000	42,34	1	0,02
2751	3070	2,217	38,22	4	0,001
2768	3094	3,019	15,11	4	0,001
2775		1000000	13,92	1	0,05
2813		1000000	13,16	1	0,05
2829	3160	2,066	12,64	4	0,001
2932		1000000	15,78	1	0,05
2945	3266	3,742	14,28	4	0,001
2968	3286	3,904	16,37	4	0,001
2980	3302	3,147	15,32	4	0,001
3000	3308	2,199	7,900	4	0,01
3006	3310	3,273	6,270	4	0,01
3047	3358	4,250	12,44	3	0,01
3196	3481	2,623	20,48	4	0,001
3208	3493	2,208	9,873	4	0,001
3243	3537	2,855	6,852	3	0,01
3244	3536	2,738	7,882	4	0,01
3258	3539	3,454	13,00	4	0,001
3284	3613	2,592	35,99	4	0,001

3290	3591	2,033	46,93	4	0,001
3291	3582	5,269	30,33	4	0,001
3303	3598	2,233	18,99	4	0,001
3325	3618	2,481	14,65	4	0,001
3333	3630	2,549	14,38	4	0,001
3334	3627	5,678	14,31	4	0,001
3369	3659	8,550	9,250	3	0,01
3384		1000000	20,95	1	0,05

CP 645T

T.ID	L.ID	VD - CP 645T3	Teste <i>t</i>	GL	<i>p</i><
2996		1000000	21,16	1	0,05
3033	2686	2,571	16,99	4	0,001
3067	2731	3,073	8,707	4	0,001
3086	2748	2,565	7,151	4	0,01
3087	2760	2,985	8,903	4	0,001
3131	2790	2,161	5,836	4	0,01
3167	2527	8,139	11,37	4	0,001
3200		1000000	43,69	1	0,02
3208		1000000	14,24	1	0,05
3219		1000000	12,75	1	0,05
3231	2887	4,848	11,69	3	0,01
3282	2956	2,203	7,141	4	0,01
3301		1000000	31,89	1	0,02
3329	3009	2,978	7,917	3	0,01
3451		1000000	72,33	1	0,01
3503	3219	2,900	8,389	4	0,01
3522	3235	3,515	7,554	2	0,02
3538	3250	2,406	10,15	4	0,001
3551		1000000	59,60	1	0,02
3554	3256	2,459	9,608	4	0,001
3555	3257	2,246	8,702	4	0,001
3556	3259	3,037	5,986	3	0,01
3594		1000000	30,38	1	0,05
3597		1000000	44,12	1	0,02
3604		1000000	192,9	1	0,01

3633	3346	12,28	28,56	4	0,001
3679		1000000	13,79	1	0,05

NOTA: **L.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de linfonodo axilar; **T.ID** - número de identificação do *spot* na amostra de tumor primário; **VD** - valor de expressão diferencial (1000000 - número fornecido pelo programa como valor absoluto que indica a presença do *spot* no gel analisado e ausência na amostra comparada). O valor diferencial calculado pelo programa *ImageMastertm* é avaliado com base no volume de cada *spot*, assim como o resultado do teste *t* de Student.; **GL** - grau de liberdade; valor de **p**.

FONTE: o autor (2011).

A banda correspondente a proteína Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA) foi observada somente no linfonodo axilar, enquanto outras apresentaram aumento de expressão no mesmo. São elas: Proteína ligante de selênio 1 (SBP1); Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7); Gama-enolase (ENOG); Microtúbulo-actina fator de ligação cruzada 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1); Proteína RING finger 213 (RN213); Vitronectina (VTNC); Antígeno KI-67 (KI67); Fator de alongação Ts mitocondrial (EFTS); Inositol monofosfatase 1 (IMPA1); Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2); Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1); Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6); Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento (GRB2); Peroxiredoxin-1 (PRDX1). Em seis *spots* removidos não foi possível identificação (TABELA 17).

Nesta amostra CP 645T, foram observadas bandas exclusivas do tumor primário identificadas como: Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7), Aspartil tRNA sintetase citoplasmática (SYDC), Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA), Proteína CYR61(CYR61), Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6). Em *spots* com expressão aumentada no tumor, foram identificadas as seguintes proteínas: Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8); Alfa-1 antitripsina (A1AT); Vimentina (VIME); Tropomiosina cadeia alfa 4 (TPM4); Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2); Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1); Proteína 14-3-3 gama (1433G); Caspase-14 (CASPE); Proteína 14-3-3 teta (1433T); Apolipoproteína A-I (APOA1). Três bandas não apresentaram identificação positiva (TABELA 17).

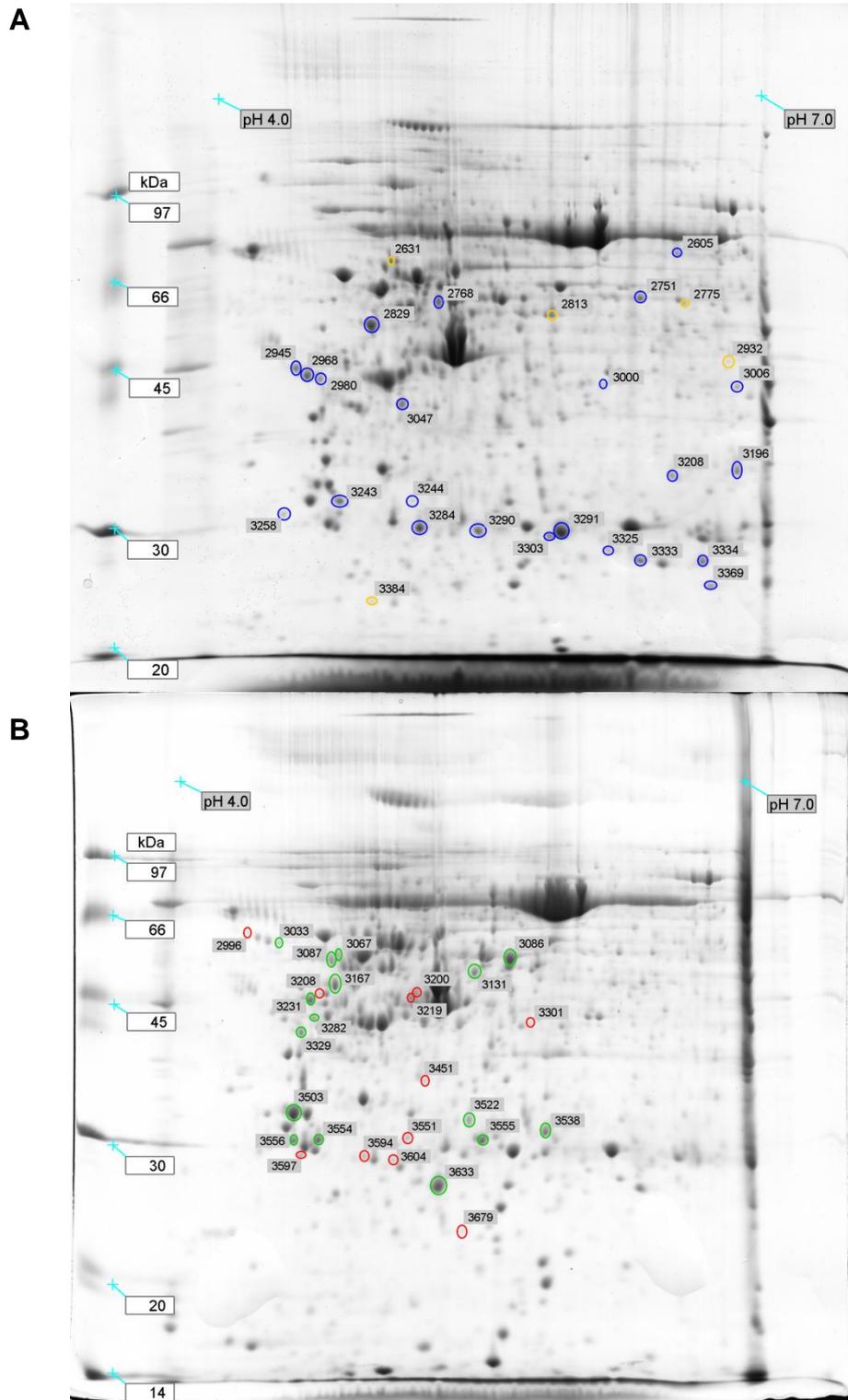


FIGURA 23 – CP 645: GÉIS BIDIMENSIONAIS COMPARADOS QUANTO AO PERFIL PROTEÔMICO ESPRESSO NO LINFONODO AXILAR E NO TUMOR PRIMÁRIO. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais detectadas pelo programa *ImageMaster™* estão destacadas em: **(A)** amarelo, presente apenas no linfonodo; azul, com aumento de expressão no linfonodo; **(B)** vermelho, apenas no tumor; e verde, expressão aumentada no tumor. FONTE: o autor (2011).

TABELA 17 – CP 645: IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIAIS OBSERVADOS EM ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O LINFONODO AXILAR E O TUMOR PRIMÁRIO

CP 645L ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c esp. MM/pl obs.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
2605	-				-		
2631	Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA_HUMAN)	P31150	GDI1	Xq28	72.00/6.52 51.18/5.00 69.00/4.93	95	52
2751	Proteína ligante de selênio 1 (SBP1_HUMAN)	Q13228	SELENBP1	1q21.3	52.93/5.93 59.00/6.31	76	15
2768	Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7_HUMAN)	P08729	KRT7	12q13.13	51.41/5.40 58.00/5.19	189	52
2829	Gama-enolase (ENOG_HUMAN)	P09104	ENO2	12p13.31	47.58/4.91 53.00/4.82	141	32
2945	Microtúbulo-actina fator de ligação cruzada 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1_HUMAN)	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	62.36/5.27 45.00/4.40	64	12
	Proteína RING finger 213 (RN213_HUMAN)	Q63HN8	RNF213	17q25.3	37.85/6.47 45.00/4.40	58	13
2968	Vitronectina (VTNC_HUMAN)	P04004	VTN	17q11.2	55.07/5.55 44.00/4.46	84	14
2980	Proteína RING finger 213 (RN213_HUMAN)	Q63HN8	RNF213	17q25.3	37.85/6.47 44.00/4.54	56	20
3000	Antígeno KI-67 (KI67_HUMAN)	P46013	MKI67	10q26.2	36.07/9.49 43.00/6.11	62	29
3006	-				-		
					43.00/6.86		
3047	-				-		
					41.00/4.99		
3196	Fator de alongação Ts mitocondrial (EFTS_HUMAN)	P43897	TSMF	12q14.1	35.71/8.62 35.00/6.86	56	43

3208	-				-		
3243	Microtúbulo-actina fator de ligação cruzada 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1_HUMAN)	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	34.00/6.49 62.36/5.27 32.00/4.64	74	24
3244	Inositol monofosfatase 1 (IMPA1_HUMAN)	P29218	IMPA1	8q21.13	30.56/5.16 32.00/5.05	79	49
3258	-				-		
3284	Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2_HUMAN)	P52566	ARHGDIB	12p12.3	31.00/4.33 23.03/5.10 30.00/5.09	67	23
3290	Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1_HUMAN)	P04792	HSPB1	7q11.23	22.83/5.98 30.00/5.41	84	40
3291	Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1_HUMAN)	P04792	HSPB1	7q11.23	22.83/5.98 30.00/5.88	71	37
3303	Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6_HUMAN)	Q96JE9	MAP6	11q13.5	86.68/9.20 30.00/5.81	70	41
3325	Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento (GRB2_HUMAN)	P62993	GRB2	17q25.1	25.30/5.89 28.00/6.14	56	46
3333	-				-		
3334	Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1_HUMAN)	P04792	HSPB1	7q11.23	27.00/6.32 22.83/5.98 27.00/6.67	114	37
3369	Peroxiredoxina 1 (PRDX1_HUMAN)	Q06830	PRDX1	1p34.1	22.32/8.27 25.00/6.71	64	36
CP 645T ID	Proteína (Sigla)	Código de Acesso SwissProt^a	Gene UniGene^b	Locus Gênico	MM/pl^c esp. MM/pl obs.	Score^d	Cobertura^e (%)
3033	-				- 58.00/4.48		

3067	-				-	90	18
3086	Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8_HUMAN)	P05787	KRT8	12q13.13	55.00/4.80 53.67/5.52 54.00/5.75	91	19
3087	Alfa-1 antitripsina (A1AT_HUMAN)	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 54.00/4.77	151	24
3131	Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8_HUMAN)	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 51.00/5.55	62	13
3167	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 48.00/4.79	169	32
3200	Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7_HUMAN)	P08729	KRT7	12q13.13	51.41/5.40 46.00/5.23	62	62
3231	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 45.00/4.65	86	50
3282	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 43.00/4.67	70	68
3301	Aspartil tRNA sintetase citoplasmática (SYDC_HUMAN)	P14868	DARS	2q21.3	57.49/6.11 42.00/5.86	57	68
3329	Vimentina (VIME_HUMAN)	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 41.00/4.60	183	31
3451	Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA_HUMAN)	P54920	NAPA	19q13.32	33.67/5.23 35.00/5.28	104	77
3503	Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4_HUMAN)	P67936	TPM4	19p13.12	28.60/ 4.67 33.00/ 4.71	99	34
3522	Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2_HUMAN)	Q9UL46	PSME2	14q12	27.50/ 5.44 32.00/ 5.56	69	21
3538	Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1_HUMAN)	Q06323	PSME1	14q12	28.90/ 5.78 31.00/ 5.96	143	52
3551	Proteína CYR61 (CYR61_HUMAN)	O00622	CYR61	1p22.3	44.16/8.64 30.00/5.19	56	28

3554	Proteína 14-3-3 gama (1433G_HUMAN)	P61981	YWHAG	7q11.23	28.40/ 4.80 31.00/ 4.82	87	35
3555	Caspase-14 (CASPE_HUMAN)	P31944	CASP14	19p13.12	27.90/ 5.44 31.00/ 5.62	76	31
3556	Proteína 14-3-3 teta (1433T_HUMAN)	P27348	YWHAQ	2p25.1	28.00/ 4.68 31.00/ 4.71	129	33
3597	-				-		
3604	Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6_HUMAN)	Q96JE9	MAP6	11q13.5	29.00/4.59 86.68/9.20 28.00/5.11	104	49
3633	Apolipoproteína A-I (APOA1_HUMAN)	P02647	APOA1	11q23.3	30.76/5.56 26.00/5.35	67	67

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada.

FONTE: o autor (2011).

6.7 Identificação protéica

Na primeira análise comparativa, do conjunto amostral de linfonodos axilares e tumores primários (item 6.5), apenas seis bandas foram identificadas. Na análise individual dos pares amostrais de linfonodos axilares e tumores primário (item 6.6), um número superior de *spots* diferenciais foi identificado, com um valor médio de 19,71 ($\pm 9,52$) *spots* diferenciais por amostra. Neste contexto, 137 proteínas foram detectadas por espectrometria de massas. Alguns exemplos de picos gerados pelo programa *FlexAnalysis 2.0* (Bruker Daltonics) podem ser observados nas FIGURAS 24 e 25, correspondente à espectros das proteínas Glutathione S transferase P (GSTP1), Vimentina (VIME) e Serotransferrina (TRFE).

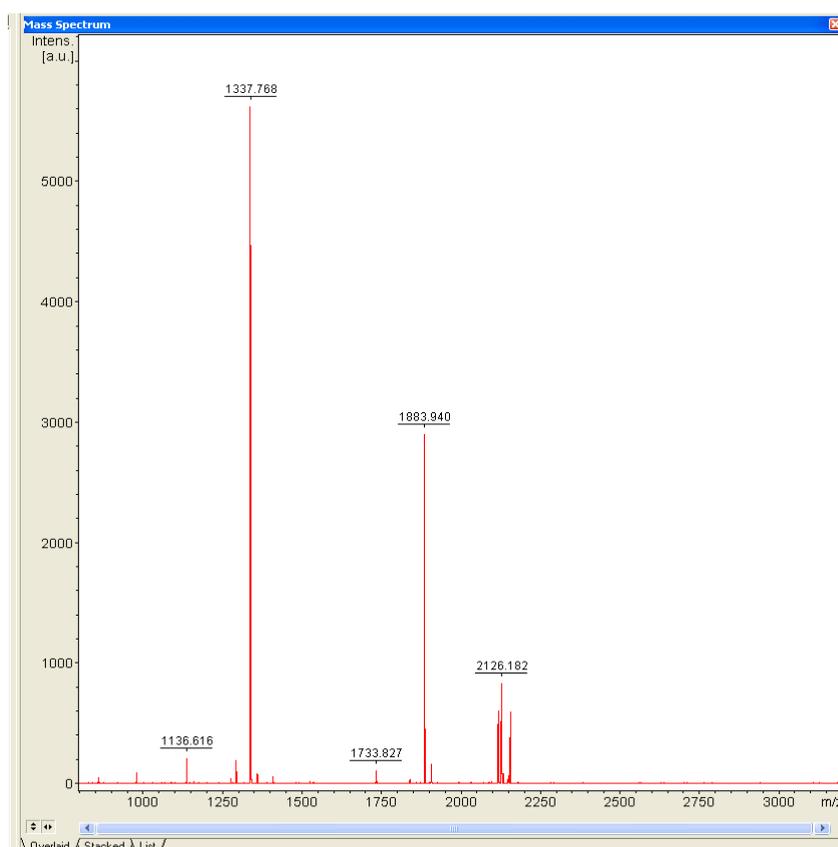


FIGURA 24 – ESPECTROS DE MASSAS GERADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE GSTP1. Identificação obtida sem purificação peptídica, com *score* de 127 e percentual de cobertura 57%.

FONTE: o autor (2011)

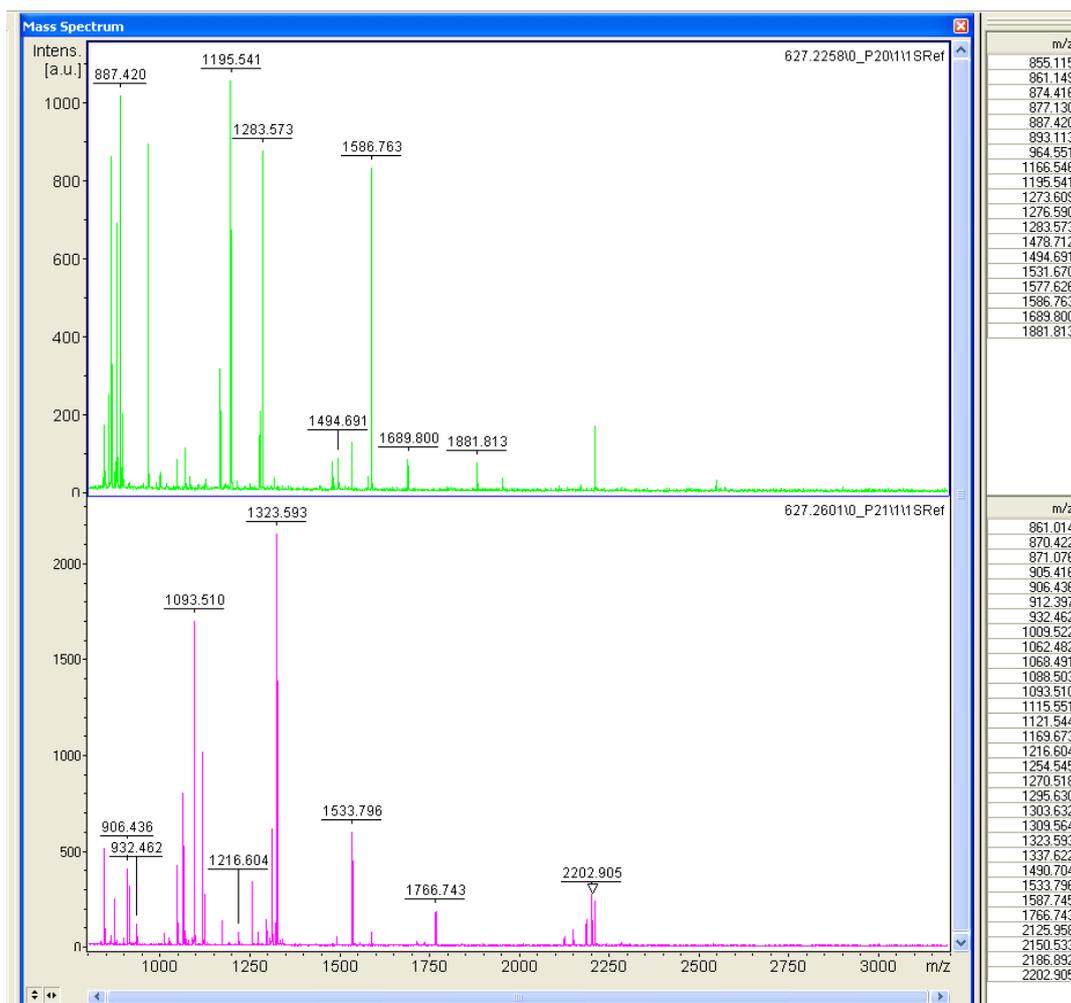


FIGURA 25 – ESPECTROS DE MASSAS GERADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE *VIME* e *TRFE*. Identificação obtida sem purificação peptídica, com score de 169 e percentual de cobertura 22% para a proteína *Serotransferrina* (acima) e 310 com 49% para *Vimentina* (abaixo). Na lateral direita aparecem os padrões de cada pico correspondente ao espectro de cada proteína.
 FONTE: o autor (2011)

O número de bandas diferenciais detectadas em todas as amostras foi de 221 e correspondem a *spots* com valor de p menor que 0,05 e confiabilidade acima de 95%. Foram selecionadas para identificação, entretanto, 162 bandas entre as amostras de linfonodos axilares (79) e tumores primários (83), referentes ao valor de p menor que 0,02, aumentando a confiabilidade do resultado de 95% para mais de 98%. Nem todas as bandas apresentaram identificação positiva por espectrometria de massa. Foram 123 (75,93% = 123/162) *spots* com espectros significativos para as análises protéicas, nos quais identificou-se 146 proteínas no total, resultando em 72 proteínas distintas.

6.8 Análise comparativa de tumores primários de mama e linfonodos axilares

Variações interindividuais, entre outros fatores, não permitiram evidenciar proteínas exclusivas em tumores primários e/ou linfonodos axilares comuns às sete amostras individuais pareadas. No entanto, alguns *spots* exclusivos ou com expressão aumentada foram observados em determinadas pacientes. Neste contexto, considerando as dificuldades metodológicas relativas a prováveis contaminações, as queratinas do citoesqueleto K2C1, K2C3, K1C9, K1C10 e K1C16, explicadas em detalhe no item 7.5.13, foram excluídas desta análise.

As TABELAS 18 e 19 apresentam os *spots* exclusivos e diferenciais, respectivamente, identificados nos linfonodos axilares metastáticos. Sete *spots* foram observados somente nos linfonodos, contudo, apenas seis proteínas foram exclusivas destas amostras. Na análise do conjunto de linfonodos, em amostras CP645L*, foram identificadas proteínas exclusivas como: Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1); Navegador 2 de neurônio (NAV2); Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B); e Vinculina (VINC). Outra proteínas apareceram com exclusividade em diferentes amostras pareadas, como CP 622L, CP 627 L e CP645L.

Entre 51 *spots* observados com expressão aumentada nos linfonodos e 39 proteínas diferentes identificadas, dentre as proteínas 28 eram exclusivas e apresentaram aumento de expressão somente nestas amostras.

TABELA 18 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS OBSERVADAS NOS LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS

Proteína	L – Spot ID	Teste t	p<
Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA)	CP 645L – 2631	42,34	0,02
Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1)	CP 645L* - 3353	5,733	0,001
Navegador 2 de neurônio (NAV2)	CP 645L* - 3353	5,733	0,001
Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B)	CP 645L* - 3161	5,146	0,001
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	CP 627L – 3534	33,17	0,02
Ubiquitina tioesterase (OTU1)	CP 622L – 2062	47,53	0,02
Vinculina (VINC)	CP 645L* - 3353	5,733	0,001

NOTA: Em destaque, proteínas exclusivas nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

TABELA 19 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA NOS LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS

Proteína	L – Spot ID	VD	Teste t	p<
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01
Actina citoplasmática 2 (ACTG)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01
Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01
Actina alfa, músculo esque-lético (ACTS)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01
Actina gama, músculo liso (ACTH)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01
Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2)	CP 641L -2085	2,609	7,439	0,01
	CP 644L -2552	2,542	14,66	0,001
Aminopectidase citosólica (AMPL)	CP 641L -2074	2,299	8,119	0,01
Antígeno KI-67 (KI67)	CP 645L -3000	2,199	7,900	0,01
Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB)	CP 644L -2774	4,518	14,21	0,001
	CP 644L -2781	2,082	5,328	0,01
Cadeia 2 Ig lambda, região C (LAC2)	CP 644L -3004	2,352	11,38	0,001
Fator de alongação Ts mitocondrial (EFTS)	CP 645L -3196	2,623	20,48	0,001
Gama-enolase (ENOG)	CP 645L -2829	2,066	12,64	0,001
Glutathiona S-transferase P (GSTP1)	CP 627L -3812	2,933	21,67	0,001
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	CP 641L -2483	2,016	4,961	0,01
Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2)	CP 641L -2491	3,837	5,812	0,01
	CP 645L -3284	2,592	35,99	0,001
Inositol monofosfatase 1 (IMPA1)	CP 645L -3244	2,738	7,882	0,01
Interleucina 6 (IL6)	CP 630L -2967	2,471	11,39	0,001
Metionil-tRNA formil-transferase, mitocondrial (FMT)	CP 627L -3673	2,234	5,689	0,02
Microtúbulo-actina fator de ligação cruzada 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1)	CP 645L -3243	2,855	6,852	0,01
	CP 645L -2945	3,742	14,28	0,001
Peroxiredoxina 1 (PRDX1)	CP 645L -3369	8,550	9,250	0,01
Peroxiredoxina 4 (PRDX4)	CP 644L -3022	2,198	5,604	0,01
Peroxiredoxina 6 (PRDX6)	CP 622L - 2164	2,364	9,404	0,001
Poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG)	CP 641L -2092	2,457	4,686	0,01
Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento (GRB2)	CP 645L -3325	2,481	14,65	0,001
Proteína 3 relacionada a actina (ARP3)	CP 641L -2129	2,641	7,039	0,01
Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6)	CP 641L -2176	11,226	11,26	0,01
	CP 645L -3303	2,233	18,99	0,001
Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA)	CP 622L - 2064	2,227	5,737	0,01
Proteína de nivelamento F-actina subunidade beta (CAPZB)	CP 641L -2433	2,248	9,699	0,001
Proteína de processamento do RNA ribossomal 1, homolog. A (RRP1)	CP 644L -2529	2,239	5,229	0,02
Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1)	CP 645L -3290	2,033	46,93	0,001
	CP 645L -3291	5,269	30,33	0,001

	CP 645L -3334	5,678	14,31	0,001
Proteína ligante de macrófago (CAPG)	CP 641L -2272	2,022	6,390	0,01
Proteína ligante de selênio 1 (SBP1)	CP 645L -2751	2,217	38,22	0,001
Proteína RING finger 213(RN213)	CP 645L -2980	3,147	15,32	0,001
	CP 645L -2945	3,742	14,28	0,001
Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7)	CP 645L -2768	3,019	15,11	0,001
Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8)	CP 630L - 2467	3,027	12,63	0,001
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19)	CP 622L - 2160	2,074	4,147	0,02
	CP 627L - 3366	3,021	9,469	0,001
	CP 630L -2677	3,824	16,81	0,001
	CP 630L -2690	2,393	12,12	0,001
Serpina B9 (SPB9)	CP 641L -2249	7,510	28,08	0,001
Vimentina (VIME)	CP 630L -2519	2,275	6,712	0,01
	CP 630L -2524	4,284	21,74	0,001
Vitronectina (VTNC)	CP 645L -2968	3,904	16,37	0,001

NOTA: Em destaque, proteínas com perfil de expressão aumentada nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

A FIGURA 26 apresenta o gel referência CP 645L, com todas as proteínas identificadas entre as amostras de linfonodos axilares, exceto o grupo 'Queratinas do citoesqueleto'. Apenas uma banda apareceu alterada em mais de uma amostra de linfonodos axilares nas comparações individuais entre pacientes. Os *spots* correspondentes a proteína Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2) estavam mais expressos nas amostras CP 641L e CP 645L, quando comparados aos respectivos *spots* dos tumores primários de mama.

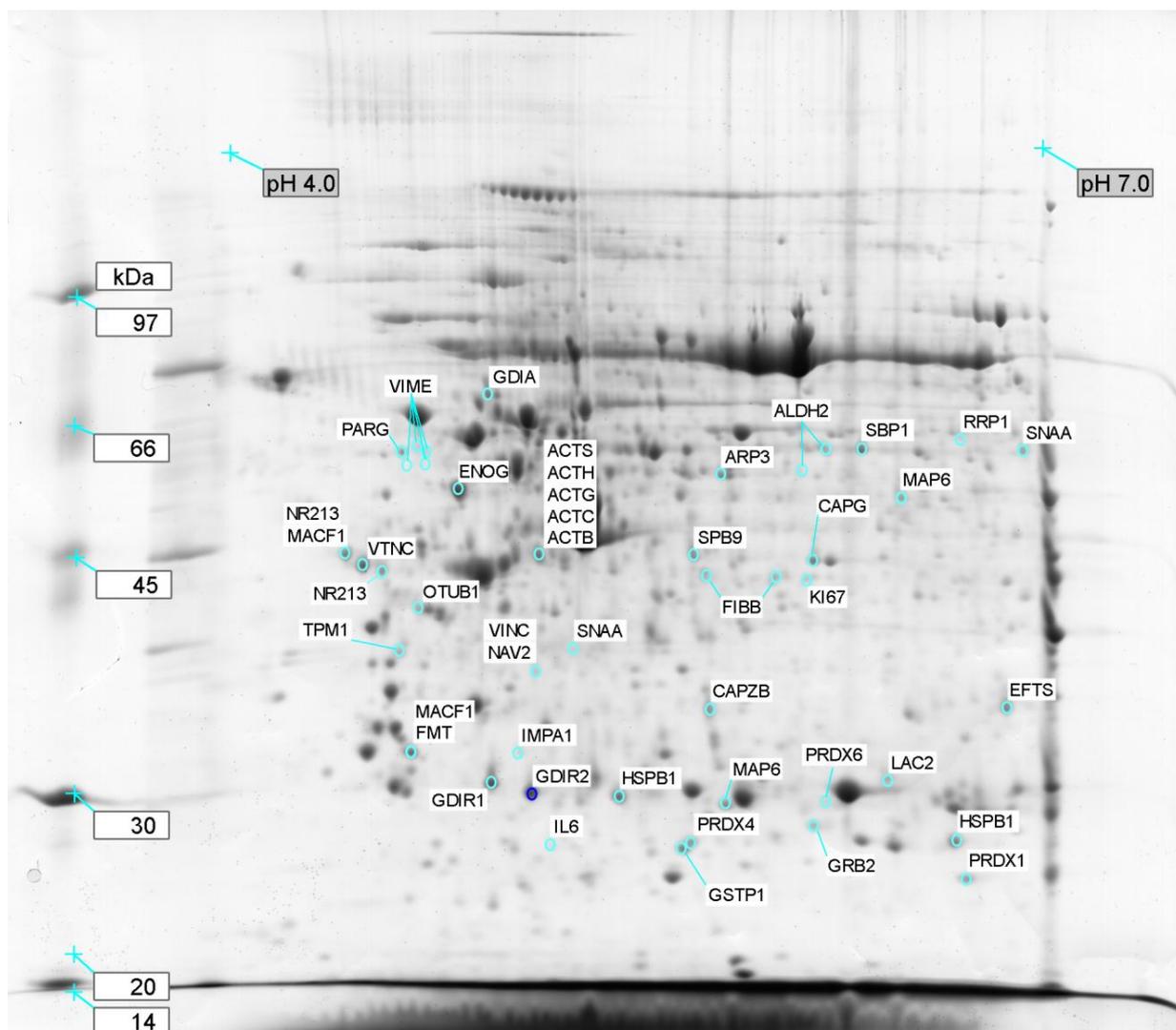


FIGURA 26 – GÉL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA REFERÊNCIA CP 645L E O PERFIL PROTEÔMICO DIFERENCIAL ESPRESSO NO CONJUNTO DE LINFONODOS AXILARES. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais, exclusivas de linfonodos axilares e/ou com expressão aumentada nos mesmos, estão destacadas em azul claro e azul escuro. A última cor indica o mesmo *spot* diferencial presente em mais de uma amostra. As identidades protéicas estão marcadas nas etiquetas com o nome abreviado do banco de dados *Swiss-Prot*. Estão incluídas na imagem as variantes MM e pl.
 FONTE: o autor (2011).

As TABELAS 20 e 21 apresentam os *spots* exclusivos e diferenciais, respectivamente, identificados em amostras de tumores primários. Oito *spots* diferenciais foram observados nos tumores, no entanto, apenas duas proteínas eram exclusivas destas amostras. Entre 61 *spots* observados com expressão aumentada nos tumores primários e 29 proteínas diferentes identificadas, 20 apresentaram aumento de expressão nestas amostras.

TABELA 20 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS OBSERVADAS SOMENTE EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

Proteína	T – Spot ID	Teste t	p<
Aspartil tRNA sintetase citoplasmática (SYDC)	CP 645T – 3301	31,89	0,02
Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA)	CP 645T – 3451	72,33	0,01
Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6)	CP 645T – 3604	192,9	0,01
Proteína CYR61 (CYR61)	CP 645T – 3551	59,60	0,02
Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7)	CP 645T – 3200	43,69	0,02
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19)	CP 633T – 6080	37,69	0,02
Vimentina (VIME)	CP 645T* - 3551	20,31	0,001
	CP 630T – 3725	42,17	0,02

NOTA: Em destaque, proteínas exclusivas nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

TABELA 21 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

Proteína	T – Spot ID	VD	Teste t	p<
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001
Actina citoplasmática 2 (ACTG)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001
Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001
Actina alfa, músculo esquelético (ACTS)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001
Actina gama, músculo liso (ACTH)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001
Alfa-1 antitripsina (A1AT)	CP 622T - 3992	2,102	4,577	0,02
	CP 627T - 2470	2,834	11,45	0,001
	CP 645T - 3087	2,985	8,903	0,001
	CP 644T - 3395	2,598	6,070	0,01
Anexina A4 (ANXA4)	CP 644T - 3850	3,569	7,168	0,02
Apolipoproteína A-I (APOA1)	CP 622T - 4247	3,552	11,43	0,001
	CP 645T - 3633	12,28	28,56	0,001
Caspase-14 (CASPE)	CP 645T - 3555	2,246	8,702	0,001
Catepsina D (CATD)	CP 630T - 4061	2,593	4,675	0,02
	CP 641T - 2451	2,852	8,406	0,01
Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1)	CP 645T - 3538	2,406	10,15	0,001
Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2)	CP 633T - 6194	2,446	6,208	0,01
	CP 645T - 3522	3,515	7,554	0,02
	CP 644T - 3881	2,411	6,296	0,01
Creatina quinase tipo B (KCRB)	CP 644T - 3608	2,471	6,419	0,01
Fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF)	CP 641T - 2543	2,942	16,90	0,001

Ferritina, cadeia leve (FRIL)	CP 630T - 4243	2,438	9,973	0,001
Nucleosídeo difosfato quinase A (NDKA)	CP 633T - 6343	2,255	8,423	0,01
Proteína 14-3-3 gama (1433G)	CP 644T - 3902	2,251	5,728	0,02
	CP 645T - 3554	2,459	9,608	0,001
Proteína 14-3-3 teta (1433T)	CP 644T - 3901	3,836	8,927	0,01
	CP 645T - 3556	3,037	5,986	0,01
Proteína zeta/delta (1433Z)	CP 644T - 3917	3,326	7,675	0,01
Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)	CP 644T - 3814	4,807	8,688	0,02
Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8)	CP 630T - 3652	3,887	9,093	0,001
	CP 645T - 3086	2,565	7,151	0,01
	CP 645T - 3131	2,161	5,836	0,01
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19)	CP 633T - 6060	4,161	10,31	0,01
	CP 633T - 6061	2,498	7,104	0,01
	CP 633T - 6064	2,279	6,164	0,01
	CP 633T - 6066	2,595	6,863	0,01
	CP 641T - 2223	2,449	4,671	0,01
Serotransferrina (TRFE)	CP 622T - 3871	2,338	7,083	0,01
	CP 622T - 3873	2,676	16,41	0,001
	CP 627T - 2257	4,608	13,24	0,001
	CP 627T - 2258	2,846	8,332	0,01
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	CP 641T - 2370	9,882	15,57	0,01
Tropomiosina cadeia beta (TPM2)	CP 641T - 2312	13,105	13,87	0,001
	CP 644T - 3847	5,555	11,67	0,01
	CP 641T - 2370	9,882	15,57	0,01
Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3)	CP 641T - 2370	9,882	15,57	0,01
Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4)	CP 641T - 2312	13,105	13,87	0,001
	CP 641T - 2434	5,573	12,56	0,01
	CP 644T - 3847	5,555	11,67	0,01
	CP 645T - 3503	2,900	8,389	0,01
Vimentina (VIME)	CP 622T - 4126	2,607	8,813	0,001
	CP 622T - 4154	3,959	6,701	0,01
	CP 627T - 2470	2,834	11,45	0,001
	CP 627T - 2592	2,858	11,18	0,001
	CP 627T - 2601	3,889	30,69	0,001
	CP 630T - 3758	11,850	39,94	0,001
	CP 645T - 3167	8,139	11,37	0,001
	CP 645T - 3231	4,848	11,69	0,01
	CP 645T - 3282	2,203	7,141	0,01
CP 645T - 3329	2,978	7,917	0,01	

Zinco-alfa-2-glicoproteína (ZA2G)	CP 641T - 2240	5,301	5,125	0,02
-----------------------------------	----------------	-------	-------	------

NOTA: Em destaque, proteínas com perfil de expressão aumentada nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

As proteínas não destacadas nas TABELAS 18, 19, 20 e 21 se referem à proteínas comuns entre amostras de tumores primários de mama e linfonodos axilares observadas, no entanto, em diferentes *spots*, ou seja, com valores distintos de MM e pl, que correspondem a diferentes isoformas destas proteínas. São elas: Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG); Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina gama, músculo liso (ACTH); Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA); Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6); Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7); Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8); Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19); Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1); e Vimentina (VIME).

A FIGURA 27 apresenta o gel referência CP 645T, com todas as proteínas identificadas nas amostras de tumores primários de mama, exceto o grupo de 'Queratinas do citoesqueleto'. As amostras destes tumores, por outro lado, apresentaram quantidade maior de bandas comuns (nove) com valores de expressão aumentada, referente a seis proteínas diferentes: Serotransferrina (TRFE), Vimentina (VIME), Tropomiosina cadeia alfa 4 (TPM4), Proteína 14-3-3 gama (1433G), Proteína 14-3-3 teta (1433T), Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PMSE2). A proteína Vimentina, como destaque, apresentou maior número de isoformas com expressão aumentada em tumores primários de mama.

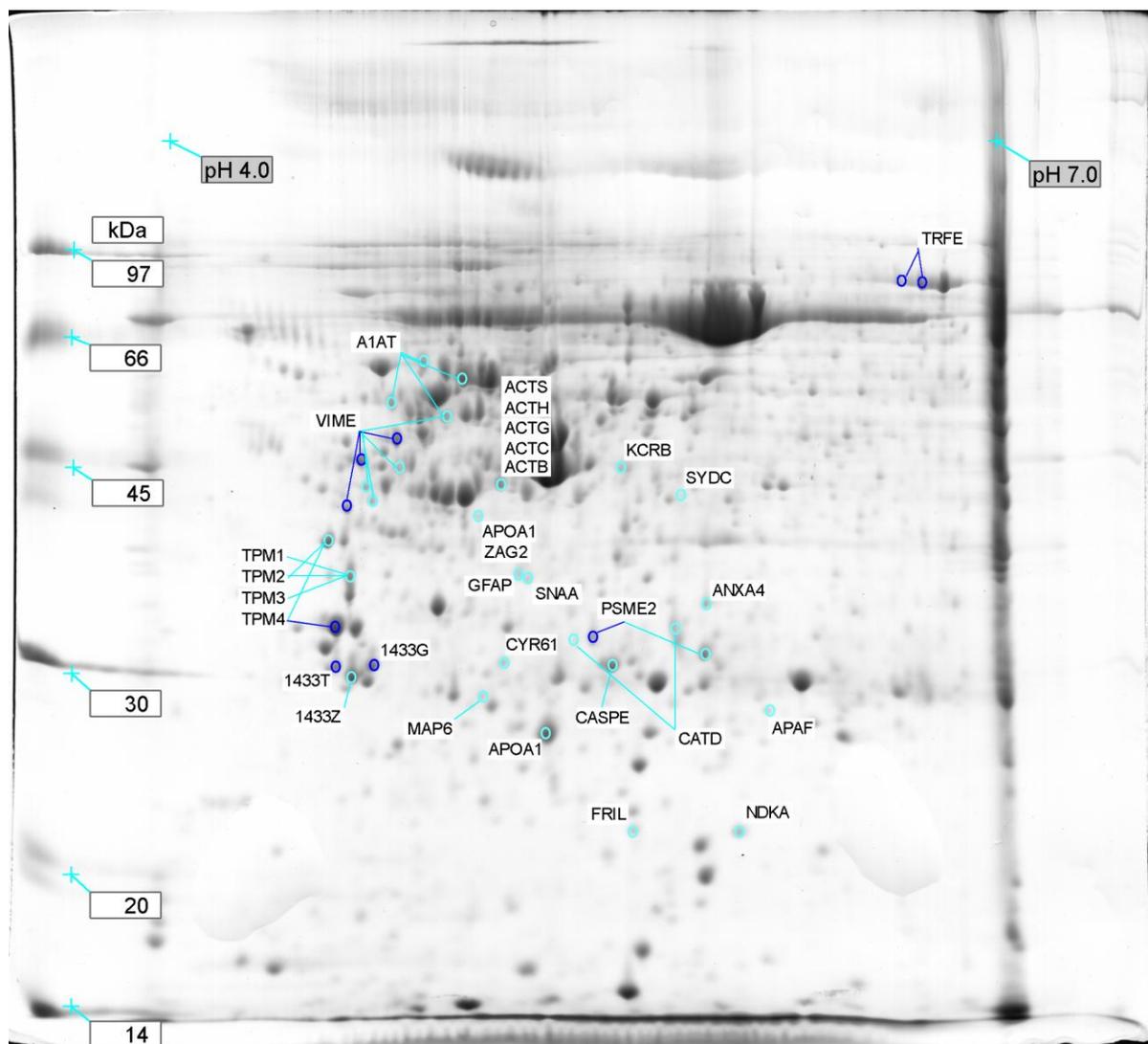


FIGURA 27 – GÉL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA REFERÊNCIA CP 645T E O PERFIL PROTEÔMICO DIFERENCIAL ESPRESSO NO CONJUNTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. As bandas diferenciais, exclusivas de tumores primários e/ou mais expressas nos mesmos, estão destacadas em azul claro e azul escuro. A última cor indica o mesmo *spot* diferencial presente em mais de uma amostra. As identidades protéicas estão marcadas nas etiquetas com o nome abreviado do *Swiss-Prot*. Estão incluídas na imagem as variantes MM e pl.
 FONTE: o autor (2011).

6.9 Grupos funcionais

Através das informações obtidas de *Minafra et al.* (2006) e bancos de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* e *NCBI* as proteínas identificadas foram classificadas de

acordo com a função biológica dentro das seguintes categorias: (1) citoesqueleto e proteínas associadas, 31,30%; (2) enzimas metabólicas, 4,76%; (3) proteínas 'heat shock'/ chaperonas moleculares, 2,04%; (4) proteínas de membrana com múltiplas atividades, 1,36%; (5) proteínas de ligação, 2,72%; (6) biossíntese de proteínas, 2,04%; (7) biossíntese de nucleotídeos, 0,68%; (8) reguladores do crescimento e da proliferação celular, 9,52%; (9) degradação protéica, 5,45%; (10) detoxificação e proteínas redox, 2,72%; (11) proteínas com atividade extracelular, 12,24%; (12) outras funções, 0,68%; e (13) queratinas do citoesqueleto, 24,49%, como subgrupo particular de 'citoesqueleto e proteínas associadas' (GRÁFICO 01 e TABELA 22). Cada proteína será analisada na 'Discussão' (item 7) dentro de seu grupo funcional.

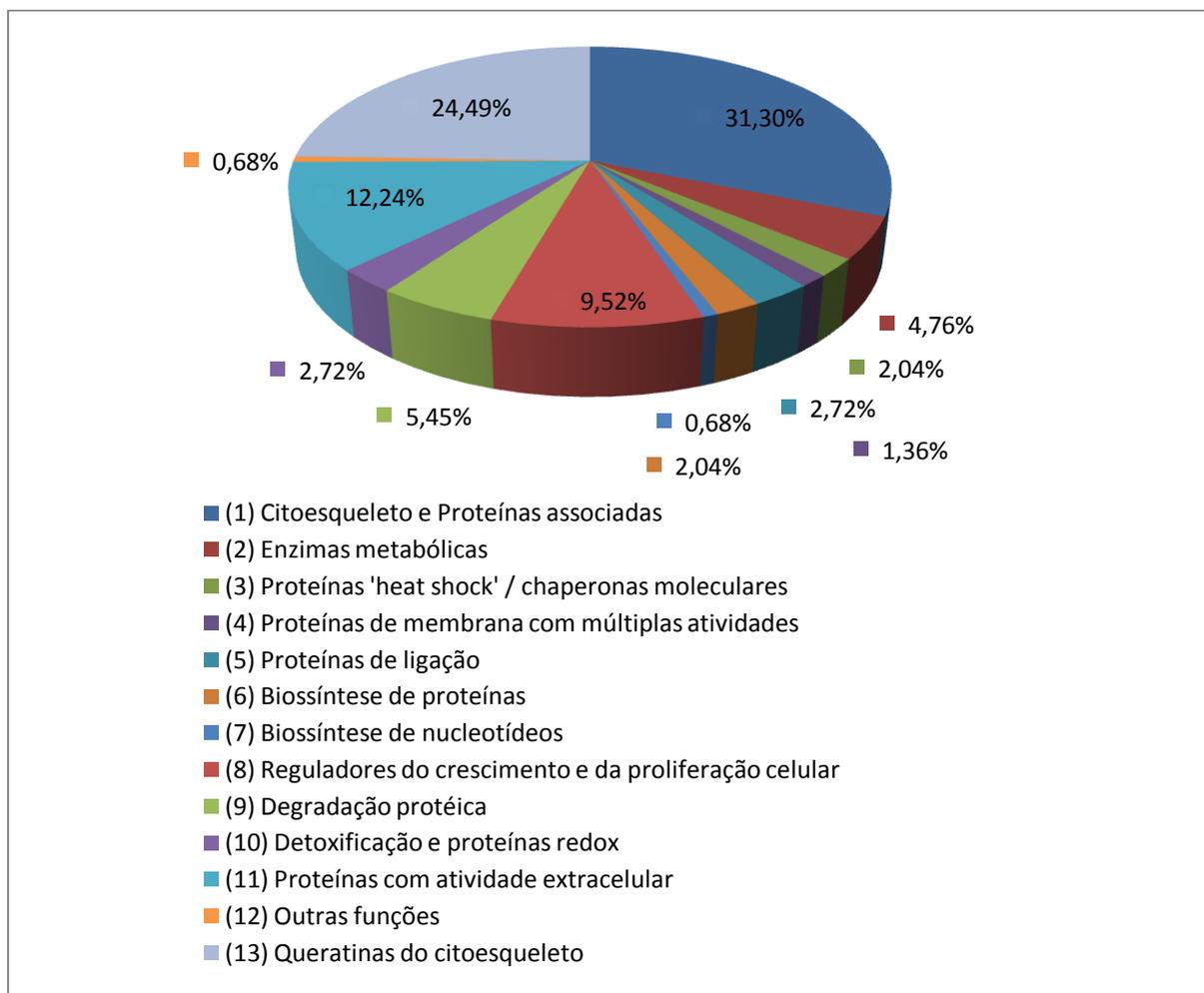


GRÁFICO 01 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS. No total, 146 proteínas identificadas foram classificadas de acordo com a função biológica em 12 categorias, com base em *Minafra et al.* (2006) e bancos de dados como *UniProtKB/ Swiss-Prot* e NCBI.

FONTE: o autor (2011).

TABELA 22 – CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ACORDO COM A SUA FUNÇÃO

Proteína	Sigla	Código de Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	Amostra – Spot ID	Localização Subcelular
Citoesqueleto e proteínas associadas						
Actina alfa 1, músculo cardíaco	(ACTC)	P68032	ACTC1	15q14	622L – 1937 641T – 2197	Citoplasma e citoesqueleto
Actina alfa, músculo esquelético	(ACTS)	P68133	ACTA1	1q42.13	622L – 1937 641T – 2197	Citoplasma e citoesqueleto
Actina citoplasmática 1	(ACTB)	P60709	ACTB	7p22.1	622L – 1937 641T – 2197	Citoplasma e citoesqueleto
Actina citoplasmática 2	(ACTG)	P63261	ACTG1	17q25.3	622L – 1937 641T – 2197	Citoplasma e citoesqueleto
Actina gama, músculo liso	(ACTH)	P63267	ACTG2	2p13.1	622L – 1937 641T – 2197	Citoplasma e citoesqueleto
Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5	(MACF1)	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	645L* – 3353 645L – 2945 645L – 3243	Citoplasma e citoesqueleto
Navegador 2 de neurônio	(NAV2)	Q8IVL1	NAV2	11p15.1	645L* – 3353	Núcleo
Proteína 3 relacionada a actina	(ARP3)	P61158	ACTR3	2q14.1	641L – 2129	Citoplasma e citoesqueleto
Proteína associada a microtúbulo 6	(MAP6)	Q96JE9	MAP6	11q13.5	641L – 2176 645L – 3303 645T – 3604	Citoplasma e citoesqueleto
Proteína de nivelamento F-actina subunidade beta	(CAPZB)	P47756	CAPZB	1p36.13	641L – 2433	Citoplasma e citoesqueleto
Proteína glial fibrilar ácida	(GFAP)	P14136	GFAP	17q21.31	644T – 3814	Citoplasma
Proteína ligante de macrófago	(CAPG)	P40121	CAPG	2p11.2	641L – 2272	Citoplasma e núcleo
Tropomiosina cadeia alfa-1	(TPM1)	P09493	TPM1	15q22.2	627L – 3534 641T – 2370	Citoplasma e citoesqueleto
Tropomiosina cadeia beta	(TPM2)	P07951	TPM2	9p13.3	641T – 2312 641T – 2370 644T – 3847	Citoplasma e citoesqueleto
Tropomiosina cadeia alfa-3	(TPM3)	P06753	TPM3	1q21.3	641T – 2370	Citoplasma e citoesqueleto

Tropomiosina cadeia alfa-4	(TPM4)	P67936	TPM4	19p13.12	641T – 2312 641T – 2434 644T – 3847 645T – 3503	Citoplasma e citoesqueleto
Vimentina	(VIME)	P08670	VIM	10p13	645T* – 3551 622T – 4126 622T – 4154 627T – 2470 627T – 2592 627T – 2601 630L – 2519 630L – 2524 630T – 3725 630T – 3758 645T – 3167 645T – 3231 645T – 3282 645T – 3329	Citoplasma e citoesqueleto
Vinculina	(VINC)	P18206	VCL	10q22.2	645L* – 3353	Citoplasma, citoesqueleto
Enzimas metabólicas						
Aldeído desidrogenase, mitocondrial	(ALDH2)	P05091	ALDH2	12q24.12	641L – 2085 644L – 2552	Matriz mitocondrial
Creatina quinase tipo B	(KCRB)	P12277	CKB	14q32.32	644T – 3608	Citoplasma
Gama-enolase	(ENOG)	P09104	ENO2	12p13.31	645L – 2829	Citoplasma e membrana celular
Inositol monofosfatase 1	(IMPA1)	P29218	IMPA1	8q21.13	645L – 3244	Citoplasma
Poli (ADP-ribose) glicohidrolase	(PARG)	Q86W56	PARG	10q11.23	641L – 2092	Citoplasma e núcleo
Proteína de processamento do RNA ribossomal 1, homolog. A	(RRP1)	P56182	RRP1	21q22.3	644L – 2529	Núcleo
Proteínas 'heat shock'/ Chaperonas moleculares						
Proteína 'heat shock' beta-1	(HSPB1)	P04792	HSPB1	7q11.23	645L – 3290 645L – 3291	Citoplasma, citoesqueleto e núcleo

645L – 3334

Proteínas de membrana com múltiplas atividades						
Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA_HUMAN)	(SNAA)	P54920	NAPA	19q13.32	<u>622L – 2064</u> 645T – 3451	Membrana
Proteínas de ligação						
Anexina A4	(ANXA4)	P09525	ANXA4	2p13.3	644T – 3850	Citoplasma
Proteína ligante de selênio 1	(SBP1)	Q13228	SELENBP1	1q21.3	645L – 2751	Citoplasma e núcleo
Proteína RING finger 213	(RN213)	Q63HN8	RNF213	17q25.3	<u>645L – 2945</u> 645L – 2980	Citoplasma
Biossíntese de proteínas						
Aspartil tRNA sintetase citoplasmática	(SYDC)	P14868	DARS	2q21.3	645T – 3301	Citoplasma
Fator de alongação Ts mitocondrial	(EFTS)	P43897	TSMF	12q14.1	645L – 3196	Mitocôndria
Metionil-tRNA formil-transferase, mitocondrial	(FMT)	Q96DP5	MTFMT	15.q22.31	627L – 3673	Mitocôndria
Biossíntese de nucleotídeos						
Nucleosídeo difosfato quinase A	(NDKA)	P15531	NME1	17q21.33	633T – 6343	Citoplasma e núcleo
Reguladores do crescimento e da proliferação celular						
Antígeno KI-67	(KI67)	P46013	MKI67	10q26.2	645L – 3000	Núcleo
Caspase-14	(CASPE)	P31944	CASP14	19p13.12	645T – 3555	Citoplasma e núcleo
Fator de ativação de protease associada à apoptose 1	(APAF)	O14727	APAF1	12q23.1	641T – 2543	Citoplasma
Inibidor de dissociação Rho GDP 1	(GDIR1)	P52565	ARHGDI A	17q25.3	641L – 2483	Citoplasma
Inibidor de dissociação Rho GDP 2	(GDIR2)	P52566	ARHGDI B	12p12.3	<u>641L – 2491</u> 645L – 3284	Citoplasma
Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP	(GDIA)	P31150	GDI1	Xq28	645L – 2631	Citoplasma
Proteína zeta/delta	(1433Z)	P63104	YWHAZ	8q22.3	644T – 3917	Citoplasma, citosol
Proteína 14-3-3 teta	(1433T)	P27348	YWHAQ	2p25.1	<u>644T – 3901</u>	Citoplasma e núcleo

Proteína 14-3-3 gama	(1433G)	P61981	YWHAG	7q11.23	645T – 3556 644T – 3902	Citoplasma, citosol
Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento	(GRB2)	P62993	GRB2	17q25.1	645T – 3554 645L – 3325	Citoplasma, Golgi
Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta	(PP1B)	P62140	PPP1CB	2p23.2	645L* – 3161	Citoplasma e núcleo
Degradação protéica						
Aminopeptidase citosólica	(AMPL)	P28838	LAP3	4p15.32	641L – 2074	Citoplasma
Catepsina D	(CATD)	P07339	CTSD	11p15.5	630T – 4061 641T – 2451	Citoplasma, lisossomo
Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1	(PSME1)	Q06323	PSME1	14q12	645T – 3538	Citoplasma
Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2	(PSME2)	Q9UL46	PSME2	14q12	633T – 6194 644T – 3881 645T – 3522	Citoplasma
Ubiquitina tioesterase	(OTUB1)	Q96FW1	OTUB1	11q13.1	622L – 2062	Citoplasma, citosol
Detoxificação e proteínas redox						
Glutationa S-transferase P	(GSTP1)	P09211	GSTP1	11q13.2	627L – 3812	Citoplasma, citosol
Peroxiredoxina 1	(PRDX1)	Q06830	PRDX1	1p34.1	645L – 3369	Citoplasma
Peroxiredoxina 4	(PRDX4)	Q13162	PRDX4	Xp22.11	644L – 3022	Secretada, citoplasma
Peroxiredoxina 6	(PRDX6)	P30041	PRDX6	1q25.1	622L – 2164	Citoplasma, lisossomo
Proteínas com atividade extracelular						
Alfa-1 antitripsina	(A1AT)	P01009	SERPINA1	14q32.13	622T – 3992 627T – 2470 644T – 3395 645T – 3087	Secretada, matrix extracelular
Apolipoproteína A-I	(APOA1)	P02647	APOA1	11q23.3	622T – 4247 645T – 3633	Secretada
Cadeia beta do fibrinogênio	(FIBB)	P02675	FGB	4q31.3	644L – 2774 644L – 2781	Secretada

Cadeia 2 Ig lambda, região C	(LAC2)	P0CG05	IGLC2	22q11.2	644L – 3004	Secretada, matrix extracelular
Interleucina 6	(IL6)	P05231	IL6	7p15.3	630L – 2967	Secretada
Proteína CYR61	(CYR61)	O00622	CYR61	1p22.3	645T – 3551	Secretada
Serotransferrina	(TRFE)	P02787	TF	3q22.1	622T – 3871 622T – 3873 627T – 2257 627T – 2258	Secretada, plasma
Serpina B9	(SPB9)	P50453	SERPINB9	6p25.2	641L – 2249	Citoplasma e matriz extracelular
Vitronectina	(VTNC)	P04004	VTN	17q11.2	645L – 2968	Secretada, matrix extracelular
Zinco-alfa-2-glicoproteína	(ZA2G)	P25311	AZGP1	7q22.1	641T – 2240	Secretada
Outras funções						
Ferritina, cadeia leve	(FRIL)	P02792	FTL	19q13.33	630T – 4243	Citoplasma e citosol
Queratinas do citoesqueleto						
Queratina do citoesqueleto 1, tipo II	(K2C1)	P04264	KRT1	12q13.13	645T* – 3369 645T* – 3551 645T* – 3581 645T* – 3651 622T – 4154 630L – 2521 630L – 2526 630L – 2710 630L – 2901 630L – 2961 633L – 5086 644L – 2714 644T – 3924 644T – 4016	Membrana celular
Queratina do citoesqueleto 3, tipo II	(K2C3)	P12035	KRT3	12q13.13	633L – 5086 633T – 6060	Citoplasma e citoesqueleto
Queratina do citoesqueleto 7, tipo II	(K2C7)	P08729	KRT7	12q13.13	645L – 2768	Citoplasma

Queratina do citoesqueleto 8, tipo II	(K2C8)	P05787	KRT8	12q13.13	645T – 3200	Citoplasma e núcleo
					630L – 2467	
					630T – 3652	
					645L – 3086	
					645T – 3131	
Queratina do citoesqueleto 9, tipo I	(K1C9)	P35527	KRT9	17q21.2	644T – 3924	Citoplasma e citoesqueleto
Queratina do citoesqueleto 10, tipo I	(K1C10)	P13645	KRT10	17q21.2	644T – 4016	Citoplasma e citoesqueleto
Queratina do citoesqueleto 16, tipo I	(K1C16)	P08779	KRT16	17q21.2	627L – 3534	Citoplasma e citoesqueleto
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I	(K1C19)	P08727	KRT19	17q21.2	633L – 5086	Citoplasma e citoesqueleto
					622L – 2160	
					627L – 3366	
					630L – 2677	
					630L – 2690	
					633T – 6060	
					633T – 6061	
					633T – 6064	
					633T – 6066	
					633T – 6080	
641T – 2223						

^a Número de acesso da proteína no *Swiss-Prot* (<http://expasy.org/sprot/>).

^b Gene referente à proteína detectada, com base em *UniGene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>)

7. DISCUSSÃO

7.1 Parâmetros avaliados

O estudo do câncer constitui um esforço comum para integrar o conhecimento sobre a estrutura, função e dinâmica de genes e proteínas envolvidos na carcinogênese. Neste contexto, é fundamental a concepção de genética e de padrões de expressão proteica em diferentes tecidos, saudáveis e doentes, úteis em pesquisas básicas e aplicadas (MINAFRA, 2006).

Apesar dos avanços recentes na terapia do câncer, o câncer de mama ainda é uma das causas mais freqüentes de morte pela doença entre as mulheres. Uma das principais razões para esse prognóstico é o conhecimento insuficiente dos mecanismos moleculares da carcinogênese em geral e do câncer de mama em particular (MINAFRA, 2006). De fato, as neoplasias mamárias são consideradas multifacetadas e podem evoluir com elevado grau de variabilidade de um paciente para outro, mesmo nos casos em que os pacientes foram classificados dentro do mesmo grupo clínico (VECCHI *et al.*, 2008).

Os carcinomas ductais invasivos (CDI) são os mais freqüentes e compreendem 65 a 80% dos casos de câncer de mama. Estes podem variar em tamanho, aparência e consistência, dependendo da composição da lesão e da origem neoplásica. No câncer de mama a presença de marcadores específicos vem sendo utilizada para orientação de respostas terapêuticas e tratamentos específicos, no entanto, apenas três são utilizados na prática clínica (*HER-2*, RE, RP). Os biomarcadores são fundamentais para categorizar tumores em diferentes grupos, principalmente, quando combinados a outras informações relevantes como tamanho do tumor, grau histológico, invasão linfática e estágio nodular (PAYNE *et al.*, 2008).

Neste trabalho, a maioria das pacientes apresentou carcinomas do tipo ductal invasivo com informações histopatológicas (grau, tamanho do tumor, número de nódulos e metástases), imunohistoquímicas (*HER-2*, receptor de estrogênio e progesterona) e clínicas (história familiar). A única amostra de carcinoma do tipo lobular, presente em uma das oito pacientes, não se mostrou representativa e foi excluída da análise. O pequeno número de amostras analisadas e informações

disponíveis não definiram, no entanto, uma associação entre os dados patológicos das pacientes e o perfil proteômico, como objetivo deste estudo.

A presença de metástases em linfonodos axilares aparece como fator isolado mais importante para definir o prognóstico do câncer de mama e representa a base de decisões terapêuticas (CAVALLI, 2009). Análises de amostras pareadas de tumores primários de mama e linfonodos axilares da mesma paciente, como proposta deste trabalho, contribuem para a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de metástase, fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativa de um comportamento clínico particular de cada neoplasia (SUZUKI & TARIN, 2007; VECCHI, *et al.*, 2008). A presença significativa de DNA alterado e proteínas diferenciais em lesões metastáticas de linfonodos axilares também podem futuramente contribuir como valor preditivo em biópsias de linfonodos (MINAFRA, 2006; SANTOS *et al.*, 2008).

A idéia geral é que cada tipo de câncer tenha sua própria impressão digital molecular ou "assinatura biológica" (um termo importado da exobiologia). As células tumorais apresentam alterações muitas vezes de difícil interpretação por serem complexas e contraditórias. A ampla variabilidade molecular de tumores de mama gera a problemática para o diagnóstico, prognóstico e terapia. A avaliação da expressão global através da comparação dos proteomas permite revelar proteínas envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem após estímulos de diferenciação e maturação celular. O monitoramento do nível de proteínas, através da proteômica quantitativa, possibilita a análise da regulação da expressão gênica que ocorre em processos pós-transcrição e pós-tradução, e fornecem numerosas informações quanto à função biológica e ao envolvimento de peptídeos em vias de sinalização celular (MINAFRA, 2006).

7.2 Metodologias proteômicas

O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de uma amostra para outra, e deve ser estabelecido para cada caso em particular (HERBERT, 1999). Os procedimentos desenvolvidos para amostras de

tumores primários e linfonodos axilares apresentaram resultados satisfatórios e particulares. A quantificação, como etapa primordial, é uma métrica importante durante a purificação de proteínas para o cálculo de rendimento, balanço de massa, ou a determinação da atividade específica/potência da proteína alvo. Os ensaios espectrofotométricos, em comparação com outros métodos, podem ser executados com alto rendimento, utilizando reagentes de baixo custo e equipamentos encontrados na maioria dos laboratórios de bioquímica. Ensaio como esse exigem um padrão adequado de proteína ou componente de informação da seqüência de aminoácidos para uma boa estimativa da concentração em soluções (NOBLE & BAILEY, 2009). Neste contexto, a leitura padrão com BSA se mostrou significativa e eficiente para a quantificação das proteínas.

O ensaio de Bradford engloba preparações do corante *Coomassie Brilliant Blue* utilizado para fins de quantificação de proteínas e foi primeiramente descrito por Bradford em 1976. O mecanismo básico do ensaio é a ligação do corante em pH ácido com arginina, histidina, fenilalanina, triptofano e resíduos de tirosina, e interações hidrofóbicas. Após a ligação, uma mudança cromática é observada devido à estabilização da forma aniônica do corante. As vantagens do ensaio de Bradford incluem a facilidade de uso, sensibilidade e baixo custo dos reagentes (NOBLE & BAILEY, 2009).

Por outro lado, o ensaio de Bradford é sensível também a interferências de vários reagentes, dentre eles a maioria dos detergentes iônicos e não iônicos e proteínas glicosiladas. Amostras solubilizadas em tampão de lise podem ser quantificadas por Bradford desde que a diluição dos compostos não atinja o limite de interferência para CHAPS, um detergente zwitteriônico / não iônico, e uréia. Ainda, uma variação significativa na resposta entre vários fornecedores comerciais de Bradford foi observada. Alterações na formulação do reagente de Bradford relatados podem modificar a resposta gerada a partir de proteínas específicas, no caso de diferentes fornecedores ou preparações (NOBLE *et al.*, 2007). Apesar das desvantagens mencionadas, é o ensaio mais amplamente utilizado em métodos proteômicos para a construção de géis bidimensionais, embora existam outras reações de maior precisão para proteomas (BERKELMAN, 2008).

A metodologia de eletroforese bidimensional escolhida para o desenvolvimento deste trabalho apresenta vantagens em descobertas recentes de técnicas proteômicas, na construção de perfis protéicos e na identificação de novos

biomarcadores. A utilidade da metodologia com géis tem estimulado, também, o desenvolvimento comercial de novos reagentes e conduzido à coevolução de instrumentação para detecção mais sensível, documentação refinada, quantificação e colorimetria precisas. A coloração *Coomassie* coloidal, usada neste trabalho, atua por meio de interação eletrostáticas com aminoácidos básicos (arginina, lisina, e histidina) e por associações hidrofóbicas com resíduos aromáticos. A coloração azul brilhante não deve interferir na espectrometria de massa das bandas de proteínas excisadas, diferente de outros corantes comerciais, o que justifica a sua escolha (STEINBERG, 2009).

Avanços significativos no desenvolvimento de reagentes e técnicas proteômicas ainda não são acompanhados de forma paralela e no mesmo ritmo por ferramentas de computação e bioinformática. Não é tarefa simples analisar o resultado de géis bidimensionais em programas como o *ImageMastertm 2D Platinum v6.0*, ainda em construção e com ferramentas de análise incompletas. As amostras que apresentaram como resultado bandas exclusivas, ou melhor, presença e ausência, devem ser avaliadas com cautela, pois volumes inferiores ao padrão *saliency* definido não podem ser comparados. *Spots* são avaliados apenas quando presentes em géis de referência, o que impede uma análise completa não apenas entre amostras, mas entre as replicatas.

A subjetividade da análise não é resultado apenas da demanda tecnológica, mas se justifica ainda pela variabilidade entre indivíduos e amostras, entre os conjuntos de tumores primários de mama e de linfonodos axilares. Diversos fatores, portanto, podem explicar as variações observadas no número de bandas detectadas em cada amostra, as divergências no número de *spots* diferenciais e as diferentes proteínas identificadas entre as amostras. A variabilidade existente entre os grupos também pode ser mascarada pela homogeneidade utilizada pelo programa na comparação dos conjuntos, ao somar o volume dos *spots* correspondentes de todos os géis e dividir pelo total, desconsiderando diferenças prováveis entre as pacientes.

Para proteínas pouco abundantes, ou proteínas de alto peso molecular, ou ainda muito básicas ou ácidas, a metodologia de eletroforese bidimensional não é adequada. Em casos similares, outras metodologias de separação substituem 2D-PAGE, como a cromatografia ou análises em espectrometria de massa direta. Diferentes estudos e metodologias, portanto, devem futuramente unir dados para correlacionar as pacientes e suas alterações moleculares, em nível de proteínas,

RNA e DNA, mas também informar sobre as interações e interdependências das mesmas nos processos biológicos. É importante enfatizar que o resultado protéico é reflexo de alterações na sequência do DNA, na estrutura (epigenética) do material genético, nos transcritos gerados, em proteínas e suas modificações pós traducionais (MINAFRA *et al.*, 2006).

7.3 Identificação protéica

As proteínas foram identificadas pelo método PMF (*peptide mass fingerprinting*) e MS/MS. Antes de serem analisadas por espectrometria de massa (MALDI-ToF), as proteínas foram submetidas à digestão com a uma endoproteínase: a tripsina. Cada proteína apresenta um padrão único de digestão enzimática ou sequência de clivagem, fundamental no processo de identificação. Variáveis como a quantidade de peptídeos da amostra, calibração (interna e externa) do aparelho e intensidade do laser durante a ionização dos peptídeos, contudo, podem interferir no padrão de picos de massa. Sinais de matriz, ruído e contaminantes também comprometem as informações geradas pelo programa *FlexAnalysis 2.0* (Bruker Daltonics) e interpretações do MASCOT.

As diferenças entre massa molecular e/ou ponto isoelétrico teóricos e observados entre as bandas foram avaliados com base em parâmetros utilizados por *Dupont et al.* (2005), onde $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$. Das 146 identificações positivas, 54 (36,97%) diferiram em MM e 38 (26,03%) quanto ao pI, sendo 28 (19,18%) com valores de MM e pI fora da margem proposta ocorrendo simultaneamente. Outras 55 bandas apresentaram esses valores dentro dos padrões considerados. Em outros casos, diferentes bandas foram identificadas como sendo a mesma proteína (FIGURA 28). Situações como esta podem ser explicadas por possíveis modificações pós-traducionais (MPT) as quais muitas proteínas estão sujeitas. O conhecimento dessas modificações é extremamente importante, uma vez que podem alterar as propriedades físicas e químicas, distribuição de conformação, dobra, estabilidade, atividade e, conseqüentemente, a função das proteínas (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008). Também podem alterar

a meia-vida ou a localização da proteína na célula, reproduzidos em mudanças como MM e pl nos géis bidimensionais (ONG e PANDEY, 2001).

No câncer de mama, estudos recentes sugerem que os perfis MPT podem ser usados como "marcas bioquímicas" para o acompanhamento e verificação da função e atividade de vias de sinalização celular chaves. Esta conclusão sugere que, para a detecção precoce de carcinomas, as MPTs podem ser biomarcadores úteis (JIN & ZANGAR, 2009).

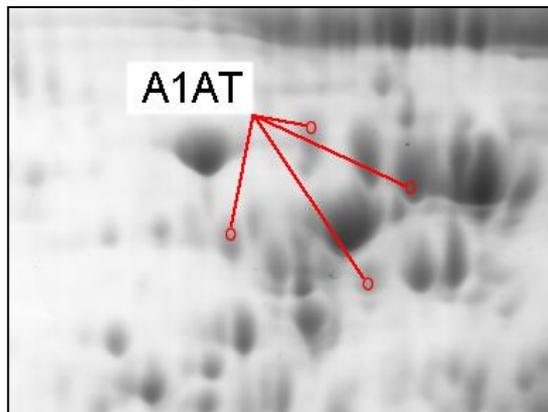


FIGURA 28 – PROTEÍNA ALFA 1 ANTITRIPSINA IDENTIFICADA EM DIFERENTES BANDAS NO CONJUNTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. As bandas correspondentes a proteína alfa 1 antitripsina estão marcadas em vermelho e diferem quando a MM e pl. A identidade protéica aparece na etiqueta com o nome abreviado (A1AT) com base no banco de dados *Swiss-Prot*. FONTE: o autor (2011).

A maioria das proteínas sofrem MPTs. O precursor da proteína pode ser submetido a uma grande variedade de clivagens proteolíticas em segmentos N- e C-terminais, e apresentar derivações de aminoácidos nas células que expressam a proteína. Ocasionalmente, o mesmo precursor é processado de forma distinta em diferentes tipos celulares. Segundo *Rehfeld & Goetze (2003)*, as modificações pós-traducionais podem ser divididos em três grupos principais: (1) clivagens endoproteolíticas, em sítios mono-, di-, tri- e tetrabásicos; (2) em porções exoproteolíticas, por exemplo, clivagens dipeptidil N- terminal e carboxiamidação; e (3) derivações em aminoácidos, como acilação, amidação, carboxilação, glicosilação, hidroxilação, isomerização, forforilação e sulfatação.

Embora vários tipos de MPTs tenham sido citadas, estas não podem ser consideradas a relação completa das possíveis modificações. Ainda podem ser acrescentadas a palmitoilação, ubiquitilação, metilação, oxidação, alquilação, mudanças na conformação tridimensional e *splicing* de proteínas, como poderosos mecanismos de diversidade protéica (DRAPER *et al.*, 2007; MOSTAQUL HUQ *et al.*, 2008; SCHARTNER *et al.*, 2007). O volume de alterações, contudo, não permite uma discussão completa de todas as possíveis MPTs e apenas algumas devem ser detalhadas neste trabalho.

As MPTs mais freqüentes são: fosforilação, oxidação, glicosilação e acetilação. Dentre essas, a fosforilação é provavelmente a modificação mais comum, importante em diversos processos celulares como: transdução de sinal; mecanismos de transcrição e tradução; metabolismo; crescimento, divisão; diferenciação; motilidade; transporte; e apoptose, entre outros (JIN & ZANGAR, 2009). As fosfatases são as enzimas responsáveis pela desfosforilação e as quinases as reponsáveis pela fosforilação. Em células de eucariotos, a maior parte de fosforilações ocorre em resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr). A identificação e caracterização dos centros de fosforilação são fundamentais para o entendimento de varias enfermidades, incluindo estudos de câncer. Numa transformação oncogênica ou estimulação de fatores de crescimento, o nível de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina aumenta de 1-2% na célula. Vários fatores de transcrição, bem como proteínas, têm mostrado mudanças na sua localização subcelular em resposta a estímulos externos. Esta MPT é capaz de alterar o ponto isoelétrico das proteínas no sentido ácido, de acordo com a quantidade de resíduos fosforilados (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

A oxidação da proteína desempenha um papel fisiopatológico importante e pode alterar a função das proteínas em processos normais e patológicos, como na carcinogênese, e durante o envelhecimento celular. Em proteínas, principalmente, ocorre oxidação da metionina em resíduos de aminoácidos, entretanto, a oxidação de cisteínas apresenta um crescente interesse por seu papel fisiológico, associado ao metabolismo antioxidante. Espécies reativas de oxigênio (ROS) também regulam a síntese e secreção de muitos ligantes de receptores, como por exemplo, fatores de crescimento e quimiocinas. Estes fatores regulam processos importantes em carcinomas epiteliais, incluindo a ativação da proliferação através de vias dependentes de ligante (MAPK/ERK) e anti-apoptose (PI3K/Akt). O estresse

oxidativo associado aos resultados da resposta imune em modificações protéicas pode ser útil para a detecção de câncer de mama inicial (JIN & ZANGAR, 2009).

Glicosilação é outra modificação pós-traducional amplamente observada em proteínas, em determinadas cadeias laterais de aminoácidos, designadas como N- e O-glicosilação. Em espécies N-glicosiladas são modificados resíduos de asparagina (Asn), enquanto a O-glicosilação ocorre em resíduos de Ser e Thr. A caracterização dos tipos de glicosilação é, no entanto, complicada. Em alguns casos, os aminoácidos num conjunto de moléculas protéicas podem ser derivados de diferentes estruturas de carboidratos, enquanto outras permanecem não modificadas. Esta heterogeneidade pode variar em espécie e tecido, e podem ser alteradas por mudanças fisiológicas, que envolvem a atividade enzimática, vias de sinalização, localização, estabilidade de proteínas e interações protéicas. Este tipo de modificação, em sua maioria, é capaz de influenciar a variação de massa através da introdução de cadeias diversas de açúcares/carbonos na estrutura das proteínas (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

A acetilação descreve uma reação que introduz um grupo funcional acetil (CH_3CO) neutro em um composto orgânico positivamente carregado, modificando seu pl. Em eucariotos, a acetilação constitui uma MPT muito comum entre as proteínas. Ocorre principalmente nos resíduos de lisina, localizados na cauda N-terminal, como parte da regulação genética e apresenta importante função entre as histonas e na estabilidade de proteínas. Tipicamente, estas reações são catalisadas por enzimas com atividade "acetiltransferase de histona" (HAt) ou "histona desacetilase" (HDAC). A acetilação de RE é mediada por histonas acetilases, capazes de alterar a sinalização dependente de estrogênio, suprimindo a sua sensibilidade (JIN & ZANGAR, 2009). As proteínas tais como actina e tropomiosina também são dependentes de acetilação para formar filamentos apropriados de actina (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

Além disso, é importante salientar que um mesmo sítio na proteína pode ser sensível à diferentes reações de modificação, de modo que diversos agentes podem interagir em sítios comuns. A fosforilação e glicosilação, por exemplo, podem concorrer nos mesmos resíduos de aminoácidos e modificar proteínas específicas. Fosforilação reversível e glicosilação alternativa induzem mudanças nas estruturas secundárias e terciárias e controlam o comportamento funcional e modular em diversas interações protéicas. O tipo de modificação, contudo, depende de fatores

como: tipo de célula, ciclo celular, sinais intra- e extracelulares, gradiente de pH, concentração de moléculas específicas, etc. Métodos proteômicos analíticos que utilizam instrumentos como, MALDI-ToF, LTQ Orbitrap e SELDI-MS, são capazes de identificar MPT, no entanto, os resultados devem ser validados através da combinação de outras técnicas mais refinadas, incluindo a marcação de isótopos estáveis (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

7.4 Proteínas diferenciais

O perfil protéico de cada paciente se encontra em constante transformação, influenciado por diversos fatores, incluindo interações célula a célula, célula e microambiente e mudanças hormonais particulares, que alteram a proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e capacidade de invadir as células/tecidos adjacentes (POLYAK & KALLURI, 2010). Além da provável diversidade entre pacientes e tumores, detalhes subjetivos da análise comparativa, em ferramentas de bioinformática ainda incompletas, devem ser considerados e os resultados de proteínas exclusivas, melhor avaliados. O fato de estarem presentes e ausentes nos géis de referência de determinada paciente não significa que o mesmo evento ocorra em outras amostras. Ao contrário, ou seja, a exclusão da proteína como diferencial também não caracteriza irrelevância da mesma em processos carcinogênicos.

Algumas bandas exclusivas de linfonodos axilares metastáticos foram identificadas em determinadas pacientes como as seguintes proteínas: Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA); Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1); Navegador 2 de neurônio (NAV2); Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B); Ubiquitina tioesterase (OTU1); e Vinculina (VINC). Essas proteínas podem indicar estágios mais avançados do desenvolvimento do tumor. Outras proteínas com evidências de aumento na expressão em linfonodos axilares podem contribuir para a elucidação de vias metabólicas e possíveis modificações pós-traducionais, fundamentais durante a evolução metastática. A proteína Inibidor de dissociação Rho GDP 2

(GDIR2) apresentou aumento de expressão em mais de uma amostra de linfonodo e a sua relevância também deve ser melhor avaliada.

Em tumores primários, apenas duas bandas se destacaram como sendo exclusivas nos mesmos, Aspartil tRNA sintetase citoplasmática (SYDC) e Proteína CYR61 (CYR61), ambas observadas em CP 645T. As amostras de tumores primários, por outro lado, apresentaram quantidade maior de bandas comuns (9) com valores de expressão aumentada, referente a seis proteínas diferentes identificadas nas amostras pareadas. São elas: Serotransferrina (TRFE), Vimentina (VIME), Tropomiosina cadeia alfa 4 (TPM4), Proteína 14-3-3 gama (1433G), Proteína 14-3-3 teta (1433T), Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PMSE2).

As proteínas diferenciais apresentaram diferenças significativas de expressão ou bandas exclusivas, tanto nos tumores primários de mama como nos linfonodos axilares, que podem corresponder a diferentes *spots* ou diferentes isoformas destas proteínas. Neste caso, o envolvimento em diversas vias regulatórias de processos tumorais e modificações pós-traducionais com alteração de função não devem ser desconsiderados. Entre elas: Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG); Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina gama, músculo liso (ACTH); Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA); Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6); Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7); Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8); Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19); Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1); e Vimentina (VIME).

7.5 Classificação funcional das proteínas

A organização proteômica em categorias funcionais de proteínas é fundamental para o desenvolvimento de mecanismos válidos para o estudo de funções bioquímicas das células e sua desregulação no câncer (MINAFRA *et al.*, 2006). Nos últimos anos, um grande número de diferentes sistemas de classificação foram desenvolvidos na tentativa de organizar e qualificar diversas proteínas. Os critérios utilizados para seleção das proteínas são variados, como exemplo: famílias

hierárquicas e superfamílias de proteínas no 'PIR-PSD', outros grupos em 'ProtoMap'; famílias de domínios da proteína, como em 'Pfam' e 'Prodom'; seqüências ou regiões conservadas, como em 'PROSITE'; classes estruturais, como em 'SCOP' e 'CATH'; e integrações de famíliaa diversas, como proposto por 'iProClass' e 'InterPro'.

Neste trabalho, o critério de classificação segue o modelo baseado em *Minafra et al.* (2006), que considera a afinidade das principais funções biológicas e, por sua vez, pode servir de instrumento para as correlações de perfis proteômicos no câncer de mama. Muitas proteínas, entretanto, apresentam características multifuncionais e a tarefa de inserir cada uma dentro de um único grupo biologicamente funcional pode ser incorreta e/ou incompleta. Por outro lado, os dados da classificação quanto à função apresentam uma contribuição consistente para estabelecer bioassinaturas e diferentes perfis, em tipos distintos de câncer de mama. Ainda, devido às múltiplas atividades conhecidas de algumas proteínas e à expansão contínua da lista de identificação protéica esta classificação é passível de revisões e modificações futuras.

Em detalhe, as proteínas foram classificadas de acordo com a função biológica dentro das seguintes categorias: (1) citoesqueleto e proteínas associadas; (2) enzimas metabólicas; (3) proteínas '*heat shock*'/ chaperonas moleculares; (4) proteínas de membrana com múltiplas atividades; (5) proteínas de ligação; (6) biossíntese de proteínas; (7) biossíntese de nucleotídeos; (8) reguladores do crescimento e da proliferação celular; (9) degradação protéica; (10) detoxificação e proteínas redox; (11) proteínas com atividade extracelular; (12) outras funções; e (13) queratinas do citoesqueleto, como subgrupo especial de 'citoesqueleto e proteínas associadas'.

7.5.1 Citoesqueleto e proteínas associadas

Constituíram 31,30% do total de proteínas identificadas neste trabalho. Foram identificados 46 *spots*, com 18 proteínas diferentes em suas funções biológicas e estruturais associadas ao citoesqueleto. O citoesqueleto é um sistema altamente complexo e dinâmico que inclui proteínas estruturais formando polímeros

(tubulina, actina e filamentos intermediários) e várias proteínas associadas com funções regulatórias. O citoesqueleto, além de representar a base que sustenta a célula, está direta ou indiretamente envolvido em vários processos celulares importantes, como polaridade celular, motilidade, adesão, dinâmica intracelular e transdução de sinal. Mudanças em células tumorais associadas ao citoesqueleto estão bem documentadas e, até mesmo, utilizadas em diagnóstico de câncer, incluindo o de mama. Não ocorrem somente diferenças no nível de expressão de proteínas do citoesqueleto durante processos de apoptose, proliferação e diferenciação, mas também há redistribuição e reorganização dessas proteínas no interior das células (MINAFRA *et al.*, 2006).

As proteínas identificadas neste grupo foram: Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG); Actina gama, músculo liso (ACTH); Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1); Navegador 2 de neurônio (NAV2); Proteína 3 relacionada a actina (ARP3); Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6); Proteína de nivelamento F-actina subunidade beta (CAPZB); Proteína glial fibrilar ácida (GFAP); Proteína ligante de macrófago (CAPG); Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1); Tropomiosina cadeia beta (TPM2); Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3); Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4); Vimentina (VIME); e Vinculina (VINC).

Actinas são proteínas altamente conservadas e fundamentais para todas as células eucarióticas. Há seis proteínas 'Actina' conhecidas em células de mamíferos: duas actinas musculares (alfa-esquelético e alfa-cardíaco), duas de músculo liso (alfa e gama), e duas não-musculares, actina do citoesqueleto (beta e gama). Cinco delas foram identificadas neste trabalho: Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina gama, músculo liso (ACTH); Actina citoplasmática 1 (ACTB); e Actina citoplasmática 2 (ACTG). As isoformas alfa, beta e gama actina apresentam funções particulares, sendo as actinas alfa um dos principais constituintes do aparelho contrátil, enquanto as actinas beta e gama participam como componentes do citoesqueleto e estão envolvidas na regulação da motilidade celular (*Uniprot*, 2011). As proteínas do citoesqueleto, como actinas, refletem mudanças relacionadas com a diferenciação e proliferação em células tumorais. Alterações em actinas podem ser característica comum em mecanismos genéticos e epigenéticos no processo carcinogênico (HEMSTREET *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2009).

A maioria das proteínas, que apresenta função regulatória em relação à organização do citoesqueleto, está envolvida em vários graus em muitos processos celulares e tem sido demonstrado ser diferencialmente expressas entre as células tumorais (MINAFRA *et al.*, 2006). A proteína Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1) promove pontes entre os diferentes elementos do citoesqueleto através de domínios especializados. Codificada pelo gene *MACF1*, é uma das proteínas de maior tamanho identificada entre as do citoesqueleto humano, com 5.430 aminoácidos. É provável que estabilizem a actina em locais onde os microtúbulos e microfilamentos interagem, atuando na dinâmica do citoesqueleto na periferia das células e na rede de microtúbulos e junções celulares (*Uniprot*, 2011).

A proteína Navegador 2 de neurônio (NAV2) é um membro da família 'navegador de neurônio' que compreende NAV1, 2 e 3. O gene *NAV2*, também conhecido como *RAINB1*, é composto de 38 exons e codifica uma proteína de 261 kDa. Dos três membros da família de navegação, *NAV2* apresenta maior semelhança com homólogo *unc-53* de *Caenorhabditis elegans*, essencial na migração longitudinal de vários tipos celulares, incluindo o desenvolvimento dos neurônios e mioblastos, e está presente ainda em célula excretora. Estudos em *C. elegans* bem como em células humanas de neuroblastoma cultivadas sugerem o envolvimento da proteína NAV2 no crescimento de neuritos e alongamento axonal (SCHMIDT *et al.*, 2009; McNEILL *et al.*, 2010). Em células humanas de neuroblastoma, NAV2 se encontra intimamente associado com elementos do citoesqueleto, incluindo microtúbulos e neurofilamentos, em domínios do citoesqueleto. Também foi proposto que a família navegador de neurônio está envolvida na reorganização do citoesqueleto para orientar mudanças no formato da célula, acompanhando as proteínas na posição terminal dos microtúbulos (McNEILL *et al.*, 2010). A relação desta proteína com o câncer de mama, contudo, não foi descrita.

A função da Proteína 3 relacionada a actina (ARP3), codificada pelo gene *ACTR3*, ainda não foi completamente estabelecida. É conhecida por ser um dos principais constituintes do complexo Arp2/3 localizado na superfície celular, essencial para dar forma e motilidade a célula, como em movimentos lamelipodiais e de protrusão. A Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6) é uma proteína de ligação e está envolvida na regulação da calmodulina, associada a estabilidade dos microtúbulos. A Proteína glial fibrilar ácida (GFAP), constituinte de filamentos

intermediários, é utilizada como marcador em células de astrócitos normais, reativos e neoplásicos. Mutações no seu gene codificador podem causar distúrbios do sistema nervoso central (*Uniprot*, 2011). A sua identificação em amostras de tumores primários de mama se torna subjetiva e deve ser melhor avaliada. Ainda, a Proteína de nivelamento F-actina subunidade beta (CAPZB) tem com o função regular o crescimento dos filamentos de nivelamento da actina na extremidade final.

A Proteína ligante de macrófago (CAPG) é um membro da família gelsolina / vilina, proteínas reguladoras da actina. Relativamente pequena (39 kDa), é codificada pelo gene *CAPG* e encontra-se distribuída difusamente por toda a célula, no citoplasma e no núcleo. No citoplasma, CAPG bloqueia as extremidades de crescimento dos filamentos de actina, controlada por concentrações intracelulares de Ca^{2+} e PIP2. Está envolvida diretamente na motilidade celular associada a actina e em movimentos de membrana, como a fagocitose de macrófagos. Defeitos em CAPG podem afetar, além da fagocitose, a motilidade em granulócitos, neutrófilos e células dendríticas. A superexpressão, por outro lado, determina um aumento na motilidade celular, capacidade de invasão e metástase, comum em células neoplásicas. O aumento de expressão, neste trabalho, foi observado na amostra CP 641, em metástases axilares, corroborando dados funcionais anteriores. A função do CAPG nuclear, no entanto, é praticamente desconhecida. Há descrições que a fração localizada no núcleo de células é essencial para o aumento da motilidade celular. Há ainda uma hipótese de que a proteína CAPG apresente interação direta ou indireta com o DNA. A seqüência do cDNA-CapG mostra sobreposição com a seqüência de um grupo de proteínas de ligação ao DNA, a família de base hélice-alça-hélice, incluindo o oncogene *c-myc*. A ligação de CAPG com a molécula de DNA, entretanto, não foi observada até o momento (RENZ & LANGOWSKI, 2008).

A atividade de transativação da proteína CAPG e a modulação de ativadores da transcrição ainda são alvos de discussão. No núcleo, PI3-quinase fosforila PIP2, PIP e proteínas potenciais para criar segundos mensageiros que regulam a síntese de DNA, direta ou indiretamente. Há evidências de que a actina pode estar associada com três tipos de complexos nucleares envolvidos na expressão gênica: complexos de remodelação da cromatina, partículas de ribonucleoproteína e as três RNA polimerases. CAPG também pode desempenhar um papel na prevenção de polimerização de actinas nucleares, como uma proteína de ligação, e influenciar indiretamente na regulação da expressão gênica (RENZ *et al.*, 2008). Uma vez que

a fração CAPG é crucial para o aumento da motilidade celular, foi observado em células tumorais uma expressão aumentada desta proteína, especialmente células metastáticas do câncer de mama (KANG *et al.*, 2010).

Ainda, entre as proteínas diferenciais, foram identificadas quatro Tropomiosinas: TPM1, TPM2, TPM3 e TPM4. As Tropomiosinas estão entre as proteínas estruturais do citoesqueleto mais estudadas, e estão envolvidas em alterações neoplásicas e na organização específica de filamentos de actina. A redução da expressão de algumas isoformas é comumente associada ao fenótipo tumoral. Essas mudanças na expressão parecem contribuir para o rearranjo de microfilamentos, alterações morfológicas e aumento da motilidade celular (HELFMAN *et al.*, 2008). As tropomiosinas apresentam uma grande diversidade em termos de tamanho, afinidade de ligação à actina, localização celular e interações com outras proteínas. Os genes que codificam as quatro variantes protéicas identificadas, *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* e *TPM4*, estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 15q22.2, 9p13.3, 1q21.3 e 19p13.12.

A vimentina (VIME) é codificada pelo gene *VIM* (*vimentin*), localizado no cromossomo 10p13, e apresenta MM e pI esperados de 53,68 kDa e 5,06, respectivamente. Em adultos, a VIME está presente em todas as células e tecidos mesenquimais e é frequentemente utilizada como um marcador de diferenciação. Como outros filamentos intermediários, a rede vimentina, está distribuída do núcleo para a membrana plasmática. Acredita-se que esta proteína atue como suporte, apoio mecânico-estrutural na célula, mantendo assim a integridade dos tecidos (MINAFRA *et al.*, 2006). Neste trabalho foi observada uma heterogeneidade de vimentina, entre *spots* diferenciais que variaram com relação a MM e pI, contudo, dentro dos parâmetros sugeridos por Dupont, *et al.* (2005), onde $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$ (FIGURA 29).

Alguns trabalhos revelaram várias outras funções-chave para a vimentina. VIME organiza uma série de proteínas críticas envolvidas na adesão, migração e sinalização celular. A fosforilação altamente dinâmica e complexa, como mecanismo de MPT, regula funções com amplas ramificações em diversos aspectos da fisiologia celular, de interações celulares e na homeostase de órgãos (IVASKA *et al.*, 2007). Embora os mecanismos exatos da função da vimentina ainda não estejam totalmente esclarecidos, as propriedades únicas acima descritas têm sido atribuídas

à dinâmica desmontagem/montagem e reorganização espacial do citoesqueleto em resposta estímulos diversos (LAHAT *et al.*, 2010).

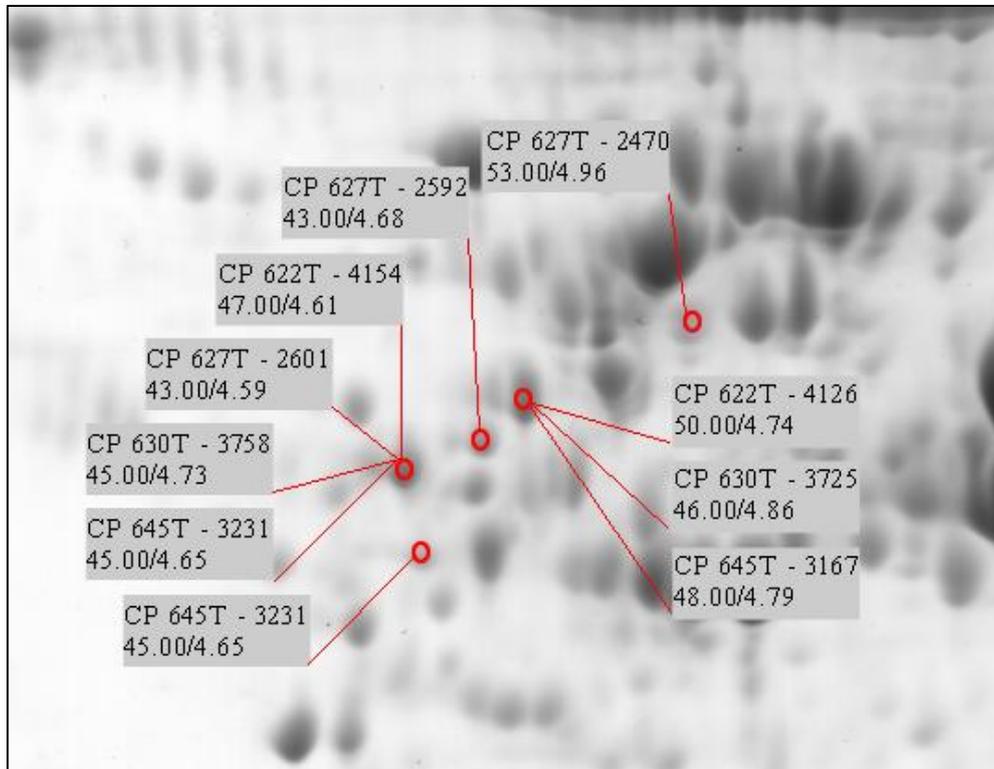


FIGURA 29 – PROTEÍNA VIMENTINA IDENTIFICADA EM DIFERENTES BANDAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. As bandas correspondentes a proteína vimentina estão marcadas em vermelho e diferem quando a MM e PI. A referência da amostra e do *spot*, bem como os valores de MM e PI observados, aparecem descritos nas etiquetas.
FONTE: o autor (2011).

A Vinculina (VINC) é uma proteína do citoesqueleto associada a interações célula-célula e a junções célula-matriz, reagindo com diversas proteínas envolvidas na ancoragem das moléculas de integrina e actina no citoesqueleto. Múltiplas variantes alternativas foram encontradas para o gene *VCL* (*vinculin*), mas a validade biológica das mesmas ainda não foi completamente determinada (*Uniprot*, 2011). Sabe-se, contudo, que a perda de vinculina altera uma grande variedade de funções celulares, impedindo a aderência das células. Por outro lado, a superexpressão de vinculina poderia restaurar a adesão e promover o recrutamento de proteínas do citoesqueleto para o complexo de adesão focal no local de ligação da integrina.

Assim, desempenha um papel importante no controle da forma com base na sua capacidade de modular a estrutura e a função das adesões focais e controlar a lamelipodia.

7.5.2 Enzimas metabólicas

Constituíram 4,76% do total de proteínas identificadas neste trabalho. O grupo foi composto por sete *spots* e seis proteínas diferentes em suas isoformas. Entre elas: Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2); Creatina quinase tipo B (KCRB); Gama-enolase (ENOG); Inositol monofosfatase 1 (IMPA1); Poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG); e Proteína de processamento do RNA ribossomal 1, homolog. A (RRP1).

A proteína Aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2), pertence à família de proteínas 'aldeído desidrogenase'. Duas principais isoformas desta enzima, citosólica e mitocondrial, podem ser distinguidas por suas mobilidades eletroforéticas, através de propriedades cinéticas e localizações subcelulares. O gene *ALDH2* codifica a isoforma mitocondrial, localizada na matriz de mitocôndrias, presente no cromossomo 12q24.12 (*Uniprot*, 2011).

As proteínas 'aldeído desidrogenase' constituem a segunda enzima da via principal do metabolismo oxidativo do álcool. Como a quantidade de álcool não é obviamente o único determinante para a lesão do órgão, fatores genéticos e ambientais podem modular e determinar os danos. Uma variedade de mecanismos pode contribuir para a carcinogênese mediada pelo álcool, incluindo o efeito tóxico de acetaldeído e / ou espécies reativas de oxigênio, a transferência de radicais metila e o metabolismo anormal da vitamina A e seus derivados. O acetaldeído é altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico. Este composto interfere em muitas vias ativas, como a síntese e o reparo do DNA, e pode, conseqüentemente, resultar no desenvolvimento do tumor. Pode também provocar mutações no locus transferase hypoxanthineguanine-fosforribosil, em linfócitos humanos, e induzir trocas de cromátides irmãs, resultando em aberrações cromossômicas complexas (SEITZ & STICKEL, 2010).

Creatina quinase tipo B (KCRB), codificada pelo gene *CKB* localizado no cromossomo 14q32.32, é uma enzima citoplasmática envolvida na homeostase energética. A proteína catalisa reversivelmente a transferência de fosfato entre ATP e diversos fosfógenos, como a creatina fosfato, nas reações em que ocorre rápida degradação e exige rápida ressíntese. *Zhou et al.* (2008) descreveram um aumento na expressão da proteína KCRB em análise proteômica comparativa de linhagens celulares, evidenciando uma possível relação desta proteína com a promoção da invasão tumoral, metástase e aumento de recidiva no câncer de mama. Esta enzima deve ser melhor avaliada como candidata a marcador tumoral e em doenças cardiovasculares (*HUDDLESTON et al.*, 2005).

O gene *ENO2* codifica a proteína Gama-enolase (ENOG), também conhecida como enolase 2 (ENO2) ou enolase neurônio-específica (NSE), encontrada em mamíferos. Constitui uma enzima glicolítica (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) responsável pela conversão de 2-fosfoglicerato (2-PG) a fosfoenolpiruvato (PEP), uma etapa da glicólise. As enolases existem na forma de diversas isoenzimas diméricas: alfa-alfa, alfa-beta, beta-beta e gama-gama. As isoenzimas gg e ag constituem ENOG e estão presentes, principalmente, nos neurônios maduros e nas células neuroendócrinas. ENOG é produzida por carcinomas de pequenas células que estão na origem neuroendócrina (*Uniprot*, 2011). A concentração elevada desta proteína pode ser observada em pacientes com carcinoma medular de tireóide, tumores de células da ilhota pancreática, feocromocitoma, neuroblastoma, carcinoma de pequenas células de pulmão e artrite reumatóide (*COWAN & VERA*, 2008). É um marcador diagnóstico de relativa especificidade (85%) para carcinoma de pequenas células de pulmão e pode ser usado para monitorar os efeitos da terapia e indicar recidivas antes de evidências clínicas. Não há, contudo, uma relação estabelecida da expressão de ENOG em carcinomas mamários.

A proteína Inositol monofosfatase 1 (IMPA1) é uma enzima codificada pelo gene *IMPA1*, localizado no cromossomo 8q21.13. Os resultados de *splicing* alternativo codificam variantes transcricionais e, por sua vez, proteínas em isoformas distintas. IMPA1 desfosforila mio-inositol monofosfato para gerar mio-inositol livre, um precursor de fosfatidilinositol e, portanto, um importante modulador da transdução de sinais intracelulares através da produção de mensageiros secundários como mio-inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol. Esta enzima também

pode usar o mio-inositol 1,3-difosfato, mio-inositol 1,4-difosfato, xilo-inositol-fosfato, glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato, frutose-1-fosfato, beta-glicerofosfato e 2'-AMP como substratos. Apresenta ainda atividade fosfatase dependente de magnésio e é inibida por concentrações terapêuticas de lítio. A inibição da hidrólise de inositol monofosfato e subsequente depleção do inositol para a síntese de fosfatidilinositol pode explicar efeitos anti-maníacos e anti-depressivos na administração de lítio para tratar pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia, entretanto, não há uma evidência genética clara da atividade do gene *IMPA1* (OHNISHI *et al.* 2006). Uma relação desta proteína com o câncer de mama ainda não foi estabelecida.

Poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG) é a principal enzima responsável pelo catabolismo de poli (ADP-ribose) (PAR), um modificador covalente reversível de proteínas cromossômicas. Atividades celulares de PARG em mamíferos são mediadas por múltiplas isoformas da proteína codificadas por um único gene, *PARG*. As três isoformas predominantes são: 111, 102 e 99 kDa (FIGURA 30), distinta em MM e pl observados neste trabalho. O comprimento total da isoforma PARG 111 kDa é normalmente encontrado no núcleo da célula. As evidências sugerem que PARG normalmente encontrado no citoplasma pode, em determinadas condições, transitar para o núcleo.

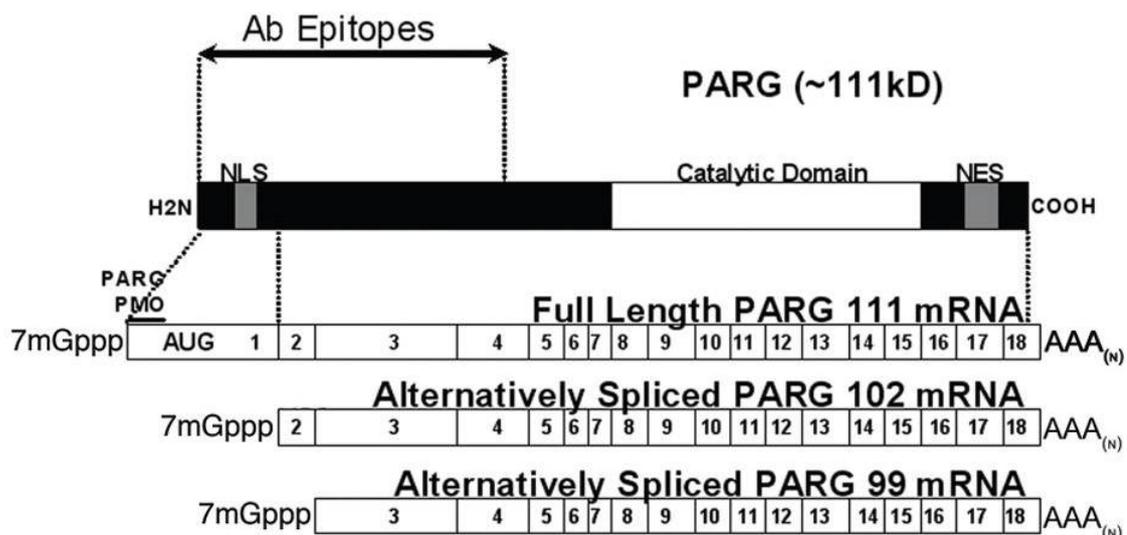


FIGURA 30 – ISOFORMAS DE POLI (ADP-RIBOSE) GLICOHIDROLASE (PARG). São elas: 111, 102 e 99 kDa.
 FONTE: BURNS *et al.*, 2009

As maiores isoformas PARG contêm dois grandes domínios funcionais: um domínio inativo e um domínio catalítico ativo. O domínio regular inativo contém sinais de localização nuclear e de exportação nuclear, que medeiam a passagem entre os compartimentos núcleo e citoplasma (BURNS *et al.*, 2009). O domínio catalítico contém o sítio ativo da enzima, que confere atividades endoglicosídicas e exoglicosídicas, permitindo a rápida hidrólise de PAR para produzir monômeros e polímeros menores de ADP-ribose (BURNS *et al.*, 2009; FRIZZELL *et al.*, 2009).

Poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP1) e Poli (ADP-ribose) glicohidrolases (PARG) são enzimas que modificam as proteínas-alvo por meio da adição e remoção, respectivamente, de polímeros PAR (BURNS *et al.*, 2009). O Papel principal de PARP é detectar e assinalar quebras de fita simples do DNA, ativando uma maquinaria enzimática envolvida no reparo. A ativação da PARP é uma resposta imediata celular a agentes químicos, metabólicos, ou a radiação induzida que causam danos ao DNA. Os mecanismos de regulação PARG, contudo, ainda são mal compreendidos. A expressão e análise de segmentos PARG humanos identificaram uma região cataliticamente ativa PARG C-terminal (hPARG59) contendo um resíduo de 16-N-terminal de seqüência na mitocôndria. A presença desta região regulatória sugere a possibilidade de que a atividade PARG é estabelecida por interações de PARP-1 e -2 e outras proteínas neste sítio. Ao contrário de PARP1, PARG não tem um domínio de ligação ao DNA. Assim, quando se liga a cromatina independentemente da PARP1, deve fazê-lo ligando-se a histonas ou através de interações com outras proteínas do DNA. Mais interessante, os resíduos MTS são freqüentemente retirados após o transporte, e oferece uma região potencial para o metabolismo de drogas PARG (BOTTA & JACOBSON, 2010). Estudos mais detalhados devem ser realizados na tentativa de elucidar o envolvimento de PARG no funcionamento molecular da célula e na evolução de neoplasias mamárias.

Proteína de processamento do RNA ribossomal 1 homolog. A (RRP1) está envolvida nos últimos estágios de nucleogênese, no final da mitose, e são importantes como constituintes de 28S (S de Svedberg = unidade de medida da velocidade de centrifugação) rRNA (*Uniprot*, 2011). Pouco se sabe sobre a Proteína de processamento do RNA ribossomal 1 homolog. A (ou RRP1A, NNP1 e NOP52), contudo, dados sugerem que o gene homolog. B (RRP1B) esteja envolvido na progressão tumoral e evolução metastática e, como gene candidato de

suscetibilidade ao câncer de mama, é potencialmente um modulador da transcrição e da dinâmica estrutural da cromatina (CRAWFORD *et al.*, 2009).

7.5.3 Proteínas 'heat shock' e chaperonas moleculares

Constituíram 2,04% do total de proteínas identificadas neste trabalho. Em três *spots* analisados, apenas uma proteína, a Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1 ou HSP27). As proteínas *heat shock* (HSP – '*Heat Shock Protein*') pertencem à classe das chaperonas definidas como proteínas celulares que mediam o desenovelamento e novo enovelamento de proteínas, na forma ou no lugar corretos. Constituem uma família de diferentes proteínas com uma função similar: o uso de energia da hidrólise de ATP para o remodelamento de proteínas. As chaperonas podem também se associar a macromoléculas, evitando ligações com outras proteínas quando ainda não corretamente enoveladas. Essas proteínas mostram capacidade de interagir com outras proteínas para auxiliar na modificação de sua conformação, reparação ou degradação se deformadas ou danificadas funcionando, portanto, como correguladoras da maquinaria do ciclo celular e da homeostase (MINAFRA *et al.*, 2006).

A resposta ao choque térmico é mecanismo de defesa onipresente e altamente conservado entre as células contra as condições de estresse ambiental e metabólico, como o calor e choque oxidativo e diversas patologias, incluindo o câncer. As HSPs são classificadas em seis grandes famílias de acordo com o tamanho e a seqüência de aminoácidos: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e smHSP. As proteínas *small heat shock* (smHSPs) pertencem a um grupo estruturalmente divergente da superfamília das chaperonas, com peso molecular variando de 12 a 43 kDa. Uma região conservada ao longo da evolução, chamada de domínio alfa-cristalino, está localizada na região C-terminal. Este domínio conservado é importante para a associação das proteínas, para a termotolerância e para a atividade de chaperonas. As smHSPs da família HSP20 são representadas por duas isoformas de HSP27, envolvidas na resistência ao estresse e organização do citoesqueleto (MINAFRA *et al.*, 2006).

O gene *HSP27* permanece ativo em condições fisiológicas específicas de tecidos / órgãos. O maior nível de *HSP27* foi observado no epitélio do esôfago e do endométrio, bem como na pele. No epitélio mamário normal o nível de expressão é baixa, diferente do observado em amostras tumorais. *Mlynarczyk-Liszka et al.* (2009), sugeriram que a superexpressão *HSP27* deve ocorrer no início da tumorigênese mamária. Apesar do grande número de dados experimentais e da presença evidente de *HSP27* superexpressa também em carcinomas mamários avançados, o seu valor prognóstico em tumores de mama é muitas vezes contraditório. *In vitro* estudos demonstraram que *HSP27* é um potente fator anti-apoptótico. A proteína *HSP27* dificulta a apoptose bloqueando a saída do citocromo c ou inibindo a ativação de caspases e pró-caspases. Neste contexto, a resistência aos agentes quimioterápicos comuns também foi observada em células com expressão elevada de *HSP27*, como resultado da sua capacidade de bloquear eventos de apoptose. Outros trabalhos demonstram que *HSP27* desempenha um papel na regulação geral da senescência celular através da modulação da via p53 (O'CALLAGHAN-SUNOL *et al.*, 2007).

7.5.4 Proteínas de membrana com múltiplas atividades

Constituíram 1,36% do total de proteínas identificadas neste trabalho. Foram identificados dois *spots*, e apenas uma proteína, a *Proteína de fusão solúvel NSF alfa* (SNAA). A seqüência da proteína ácida identificada apresenta 295 aminoácidos codificados pelo gene *NAPA*, localizado no cromossomo 19q13.32, com regiões de homologia evidenciada em diferentes organismos. As plaquetas contêm algumas dessas proteínas, incluindo: NSF, alfa-SNAP, gama-SNAP e t-SNAREs, sintaxina-2 e sintaxina-4, essenciais em muitos processos de transporte de vesículas em tipos celulares distintos. A exocitose em plaquetas envolvem mecanismos moleculares semelhantes ao utilizado por outras células secretoras, como neurônios, embora as proteínas usadas por plaquetas e seu modelo de regulação não sejam idênticos (*Uniprot*, 2011).

A 'Hipótese SNARE' é um modelo que explica o processo de ancoragem e fusão de vesículas a membranas-alvo. Segundo este modelo, as proteínas de

membrana provenientes de vesículas (v-SNAREs) e proteínas da membrana-alvo (t-SNAREs) governam a especificidade da segmentação e do encaixe uma a outra, através de reconhecimento mútuo. Os dois tipos unidos formam o complexo 20S que direciona os elementos gerais do aparato de fusão, NSF (fator sensível N-etilmaleimida) e SNAPs (proteínas de fusão solúveis NSF), para o local de união na membrana. Alfa e gama-SNAP são encontrados em uma ampla variedade de tecidos e organismos, agindo sinergicamente no transporte intra-Golgi (*Uniprot*, 2011).

A fusão das vesículas com a membrana plasmática é denominada exocitose. Vesículas de transporte se destinam a membrana plasmática normalmente, seguindo um fluxo constante a partir do complexo de Golgi. As proteínas de membrana e os lipídeos, presentes no envoltório das vesículas fornecem novos componentes para a membrana plasmática, enquanto as proteínas solúveis dentro das vesículas são secretadas para o espaço extracelular. As substâncias a serem libertadas pela célula podem ser produtos de excreção, secreções, como: toxinas, hormônios ou neurotransmissores. Como resultado do processo, a superfície total da membrana celular aumenta uma vez que agrega a membrana da vesícula e promove o crescimento das células. As substâncias do interior da vesícula são libertadas para o meio externo e, com as novas proteínas da membrana, atuam na sinalização extracelular e na regulação dos receptores e transportadores transmembrana (SUDHOF & ROTHMAN, 2009).

7.5.5 Proteínas de Ligação

Constituíram 2,72% do total de proteínas identificadas neste trabalho. Foram analisadas quatro bandas e três diferentes proteínas foram encontradas. Entre elas: Anexina A4 (ANXA4); Proteína ligante de selênio 1 (SBP1); e Proteína RING finger 213 (RN213).

As anexinas são uma família de proteínas de ligação dependentes de cálcio, capazes de se associar de modo reversível a membrana fosfolipídica. Além disso, anexinas podem estar envolvidas em interações com o citoesqueleto, a inibição da fosfolipase, sinalização intracelular e anticoagulação. Apesar de suas funções ainda

desconhecidas, vários membros da família anexina têm sido associados em eventos relacionados a membrana, em vias endocíticas e exocíticas. A Anexina A4 (ANXA4) apresenta 45-59% de identidade com outros membros de sua família, estruturalmente semelhantes, e compartilha tamanho próximo e organização exon-intron similar (MINAFRA *et al.*, 2006).

Embora entre as anexinas os sinais hidrofóbicos estejam ausentes, a secreção e expressão de alguns membros desta família na superfície da célula têm sido descritas em diversos tipos celulares. Nestes casos, algumas anexinas funcionam como receptores para proteínas extracelular. Além disso, as anexinas IV, V e VI apresentam atividade de lectina de ligação a carboidratos, sialoglicoproteínas e glicosaminoglicanos na presença de cálcio. ANXA4 apresenta também possíveis interações com ATP, atividade anticoagulante '*in vitro*' e é capaz de inibir a atividade de fosfolipases. Esta proteína é quase exclusivamente expressa em células epiteliais e pode ser alvo candidato a biomarcador em diversas neoplasias, incluindo o carcinoma mamário (MINAFRA *et al.*, 2006).

A Proteína ligante de selênio 1 (SBP1) é o produto do gene *SELENBP1* e pertence à família de proteínas de ligação do selênio. A função exata deste gene não é totalmente conhecida. O selênio, entretanto, é um nutriente essencial, com potentes propriedades antioxidantes e antitumorais. Lee *et al.* (2005) descreveram que o selênio é capaz de interromper a sinalização de receptores de estrogênio em células de câncer de mama *in vitro*. Os estrogênios exercem o seu efeito proliferativo sobre as células do câncer de mama hormônio-dependente, estimulando a progressão do ciclo celular e protegendo as células da morte por apoptose (SHAH *et al.*, 2005). É possível que a interrupção do crescimento mediada pelo selênio ative a apoptose, em parte, através da ruptura da sinalização estrogênio em células com receptores positivos no câncer de mama. Shah *et al.* (2005) mostram um mecanismo novo através da modulação da expressão do receptor de estrogênio em que o selênio pode servir como um agente quimiopreventivo no câncer de mama. A atividade anticarcinogênica de doses farmacológicas de selênio também tem sido demonstrada em modelos animais e em linhagens de células de tumores mamários. Sugere-se ainda que o selênio proteja contra o desenvolvimento de uma variedade de cânceres, incluindo próstata, cólon, esôfago, pulmão e cárdia (LEE *et al.*, 2005).

Outros trabalhos, utilizando ratos como modelo, descrevem que doses farmacológicas de selênio causam parada do ciclo celular em G1, induzem a apoptose e modulam a sinalização celular de moléculas como ciclinas A e D1, p16 e p27, resultando em redução no tamanho das lesões papilares intraductais de carcinoma mamário. Além da indução de apoptose e da inibição da proliferação celular, outros mecanismos potenciais da atividade anticarcinogênica de selênio incluem a supressão da atividade angiogênica e modulação do estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2005). Os efeitos do selênio na prevenção de câncer e doenças neurológicas podem ser mediadas por proteínas de ligação de selênio (DONG *et al.*, 2002).

A Proteína RING finger 213 (RN213), descrita recentemente, apresenta um domínio conservado rico em cisteína, capaz de ligar dois átomos de zinco. As proteínas que contêm esse domínio conservado geralmente estão envolvidas em vias de ubiquitilação e degradação protéica. RNF213, também conhecida como NET57, é uma proteína de 3.280 aminoácidos que pode atuar na regulação da transcrição e degradação de proteínas, embora sua função não seja totalmente clara. RNF213 é codificada pelo gene *RNF213*, localizado no cromossomo humano 17q25.3. Mutações em *RNF213* também apresentam uma associação com o aumento no risco de desenvolver a *Doença de Moyamoya*, uma doença oclusiva dos vasos sanguíneos cerebrais (KAMADA *et al.*, 2011).

7.5.6 Biossíntese de proteínas

Constituíram 2,04% das proteínas identificadas neste trabalho. Três *spots* e três proteínas foram observadas: Fator de alongação Ts mitocondrial (EFTS), Metionil-tRNA formil-transferase, mitocondrial (FMT) e Aspartil tRNA sintetase citoplasmática (SYDC). A tradução do mRNA em proteínas é uma atividade celular de alto consumo energético e que permite alterações rápidas nas concentrações de proteínas, sendo importante para a manutenção da homeostase e modulação de alterações na fisiologia celular. A tradução, assim como outros processos básicos da expressão gênica, é extremamente conservada evolutivamente e pode ser dividida em três etapas principais: início, alongação e terminação.

A primeira etapa ou o início da tradução é o processo que forma ribossomos competentes e requer, em eucariotos, os fatores de início de tradução (eIFs – *eukaryotic translation initiation factors*). O processo inicial consiste numa sequência de eventos envolvendo a formação do complexo ternário, composto pelo fator eIF2 ligado a uma molécula de GTP e Metionil-tRNA^{Met}. Uma vez formado, o complexo ternário se liga à subunidade ribossomal 40S originando o complexo de pré-iniciação 43S, que, em seguida, se liga ao “cap” e forma o complexo 48S. Ligado ao “cap”, o complexo 43S se move ao longo da região 5'-não traduzida (5'-UTR) do mRNA até o reconhecimento do códon iniciador, auxiliado por fatores de iniciação. Na sequência, ocorre uma mudança conformacional no complexo iniciador resultando na hidrólise de moléculas de GTP, promovendo a ligação das subunidades ribossomais, formando um complexo 80S competente para a tradução (JACKSON *et al.*, 2010).

A elongação da tradução tem início com o pareamento do anticódon presente no aminoacil-tRNA e do códon correspondente do mRNA, no sítio A (aminoacil) do ribossomo. O correto pareamento códon-anticódon, hidrolisa uma molécula de GTP, ativando o centro peptidil-transferase da subunidade 60S, que catalisa a formação de uma ligação peptídica entre o aminoácido ligado ao tRNA posicionado no sítio A (aminoacil) e a cadeia polipeptídica nascente, posicionada no sítio P (peptidil). Após a formação da ligação peptídica, ocorre a translocação, etapa responsável pela movimentação dos dois tRNAs e do mRNA através do complexo ribossomal na janela de leitura (KURATA *et al.*, 2010). O Fator de elongação Ts mitocondrial (EFTS) é codificado pelo gene *TSMF*. A proteína resultante é uma enzima que catalisa a troca de nucleotídeos guanina durante a tradução, na fase elongação da proteína mitocondrial (Uniprot, 2011).

O término da tradução ocorre quando um códon terminador é translocado para o sítio ribossomal A, sinalizando para a liberação da cadeia polipeptídica do peptidil-tRNA localizado no sítio P. Esse processo é mediado por fatores de terminação da tradução. O fator eRF1 reconhece os códons de terminação e promove a liberação da cadeia polipeptídica através da interação com o centro peptidil-transferase da subunidade 60S. Por fim, as subunidades ribossomais são recicladas para que possam ser utilizadas em um novo ciclo de tradução (JACKSON *et al.*, 2010).

Aspartil-tRNA sintetase faz parte de um complexo multienzimático do aminoacil-tRNA sintetases, fundamental para a síntese proteica. A ligação do aminoácido ao seu tRNA é realizada através da ação das aminoacil-tRNA sintetases (aaRS). A sintetase liga inicialmente uma molécula de ATP e o correspondente aminoácido (ou seu precursor) para formar um aminoacil-adenilato, com libertação de uma molécula de pirofosfato. O complexo adenilato-aaRS liga-se então à molécula de tRNA apropriada, e o aminoácido é transferido do aa-AMP para a última base de tRNA na extremidade 3' da molécula (*Uniprot*, 2011).

7.5.7 Biossíntese de nucleotídeos

Constituíram 0,68% das proteínas identificadas neste trabalho, com apenas uma banda e uma proteína encontrada. Nesta categoria, a única proteína identificada foi Nucleosídeo difosfato quinase A (NDPKA), codificada pelo gene *NM23-H1*. O produto do gene *NM23-H1* é uma NDP quinase, identificada em seres humanos com a isoforma A, purificada a partir de eritrócitos. Apresenta alta homologia com o produto do gene *NM23-H2*, identificado como o NDP quinase, isoforma B. As NDP quinases apresentam 17-20 kDa e catalisam a fosforilação de difosfato de nucleosídeos em trifosfatos de nucleosídeos, principalmente a partir do ATP sintetizado em reações de fosforilação oxidativa (TEE *et al.*, 2006).

As funções de NDP quinases amplamente aceitas são: (1) doador ATP para a síntese de NTPs, necessários na síntese de ácidos nucléicos e vários intermediários metabólicos importantes que incluem UDP-glicose e alguns CDP-lipídios derivados; (2) catalisam a transfosforilação entre GTP produzidos no ciclo de Krebs e ADP; e (3) fornecem GTP para a síntese protéica, sinalização da proteína G e polimerização da tubulina. Nucleotídeos não adenilados, especialmente GTP, apresentam numerosas funções metabólicas e reguladoras na célula. Além disso, as proporções $[GTP] / [GDP]$ e $[ATP] / [ADP]$ podem ser mantidas de diferentes maneiras a partir de processos metabólicos distintos e se NDP quinase é impedido de atuar livremente em equilíbrio com nucleotídeos de adenina e guanina (TEE *et al.*, 2006).

NM23/NDP quinase está relacionado a componentes do citoesqueleto, como a vimentina e tubulina, e envolvido em aspectos espaciais da sinalização celular. Ativação de receptores transmembrana, muitas vezes altera a organização do citoesqueleto e a associação de *NM23/NDP* quinase com proteínas estruturais, que atuam na dinâmica do citoesqueleto de remodelação após estimulação externa. Redes Vimentina mostram uma tendência a formar emaranhados e pacotes que podem ser mais densos quando reunidos na presença de *NM23/NDP* quinase, presumivelmente porque mais de um filamento pode interagir com o hexâmero quinase. A superexpressão de *NM23/NDP* quinase poderia reduzir a flexibilidade necessária para a plasticidade do citoesqueleto e movimento celular e essa propriedade poderia ser a base para ações supressivas de motilidade. Posteriormente, a invasão em tecidos por células cancerosas é, normalmente, inibida (TEE *et al.*, 2006).

Em nível celular, *NM23-H1* pode apresentar respostas interessantes, embora contraditórias, demonstradas em diferentes tipos de células cancerosas. Em células de melanoma e carcinoma de mama, por exemplo, a superexpressão do *nm23-H1*, com resposta reduzida de *TGF- β 1*, foi observada. A motilidade em resposta a fatores de crescimento derivado de plaquetas e outros componentes do soro é intensamente inibida. Além disso, há sugestões de que o acetato de medroxiprogesterona eleva a expressão do gene supressor de metástase *nm23-H1*, reduzindo assim a colonização metastática em células de carcinoma de mama humano com potencial de metastatizar (PALMIERI *et al.*, 2005).

7.5.8 Reguladores do crescimento e da proliferação celular

Constituíram 9,52% do total de proteínas identificadas neste trabalho. Composto por 14 *spots* e 11 proteínas diferentes: Antígeno KI-67 (KI67); Caspase-14 (CASPE); Fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF); Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1); Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2); Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA); Proteína zeta/delta (1433Z) Proteína 14-3-3 teta (1433T) Proteína 14-3-3 gama (1433G) Proteína 2 ligada a

receptor de fator de crescimento (GRB2); Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B).

O Antígeno KI-67 (KI67) é uma proteína nuclear diretamente associada a proliferação celular, codificada pelo gene *MKI67*. Está presente nas células em proliferação, nas fases G1, S, G2 e M, exceto na fase G0. A proteína KI67 é um indicador de prognóstico adverso e sua hiperexpressão se correlaciona com atividade mitótica elevada, indiferenciação celular e maior tendência a invasão. O anticorpo monoclonal KI67 reage com uma proteína nuclear, presente exclusivamente em células em proliferação. A determinação da expressão do KI67 constitui um método importante para avaliação da atividade proliferativa das células tumorais. A expressão aumentada de KI67 indica um elevado índice proliferativo, maior agressividade ao tumor e tem sido associada à menor sobrevida livre de doença. Foi observada uma elevada expressão de KI67 nos tumores de mama do tipo triplonegativo e expressão diminuída nos tumores do tipo luminal.

A proteína Caspase-14 (CASPE) é uma protease da família caspase, codificada pelo gene *CASP14*, localizado no cromossomo 19p13.12. As proteases cisteína aspartato específicas (caspases) são responsáveis pela apoptose celular e estão envolvidas, em sua maioria, em processos inflamatórios. A forma de zimogênio de todas as caspases é composta de um domínio maior e pequenas subunidades catalíticas, que dimerizam para formar a enzima ativa. A Caspase-14 é o membro mais divergente da família das caspases de mamíferos, conservada evolutivamente, e apresenta uma variedade de características únicas (DENECKER *et al.*, 2008). O seu processamento proteolítico foi associado principalmente a diferenciação das células epiteliais. Também, é expressa em um número limitado de tecidos. *Koenig et al.* (2005) descreveram que 40% dos carcinomas de células escamosas de pulmão, 22% dos cânceres de mama, e cerca de 80% dos carcinomas do colo do útero expressam a Caspase-14. A imuno-histoquímica revelou também que a Caspase-14 está localizada em áreas de diferenciação, em sítios de necrose. Alterações específicas do tumor na expressão de caspase-14 sugerem que as diferenças na sua expressão podem definir os subconjuntos de cânceres de origem epitelial, com diferentes comportamentos clínicos. Além dos carcinomas da mama ductal, in situ e invasivo, metaplasias apócrinas e lesões histológicas também apresentam níveis aumentados de Caspase-14. Delinear os mecanismos responsáveis pela alteração da expressão da Caspase-14 em

cânceres podem eventualmente fornecer *insights* sobre os mecanismos carcinogênicos de tecidos específicos e elucidar rotas de sinalização que envolvem a regulação desta protease, além de contribuir para elaboração de estratégias terapêuticas (KRAJEWSKA *et al.*, 2005).

O Fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF ou APAF-1) é codificado pelo gene *APAF1*, localizado no cromossomo 12q23.1. APAF-1 constitui uma proteína citoplasmática de 130 kDa envolvida em vias iniciais que controlam a apoptose. Esta proteína contém três regiões funcionais: um domínio N-terminal de recrutamento da caspase 9 (CARD); um domínio de ATPase (CED4); e um regulatório C-terminal com repetições de WD-40. Ao se ligar ao citocromo C, liberado da mitocôndria no início do processo de morte celular por apoptose, APAF-1 constitui parte do apoptossomo e participa com a Caspase-9 da ativação do citocromo-C dependente de Caspase-3 que, posteriormente, desencadeia a ativação de outras caspases e coordena o processo de morte celular por apoptose (*Uniprot*, 2011). Em células de mamíferos, APAF-1 forma um complexo ternário com a Caspase-9 e BCLxL, um membro anti-apoptótico da família BCL2, com BCLxL sendo capaz de inibir a ativação da caspase-9 pela APAF-1. A associação de várias outras proteínas pode impedir a formação de um apoptossomo ativo. Uma das proteínas de choque térmico, HSP70, é capaz de inibir a apoptose, impedindo o recrutamento de caspase-9 à APAF-1. Esta proteína pode se associar também a outras proteases, incluindo a caspase-4, caspase-8, e CED3 em células de mamíferos. *Soengas et al.* (2001) descreveram que APAF-1 é inativada em melanomas metastáticos e que isso resulta em defeitos na determinação da morte celular por apoptose. APAF-1 parece ser um regulador chave da morte celular programada no desenvolvimento dos mamíferos, embora a apoptose também ocorra através de processos alternativos da sinalização independente de APAF-1 expressão e totalmente dissociada de qualquer tratamento de caspases. *Vinothini et al.* (2011) observaram uma diminuição na expressão de APAF-1 em pacientes com câncer de mama, sendo observado uma variação maior em pacientes com tumores de mama grau III e/ou mulheres na menopausa.

O Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1) e o Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2), são codificados pelos genes *ARHGDI1* e *ARHGDI2*, respectivamente, conhecidos como genes Rho. Pertencem à superfamília de genes RAS codificadores de pequenos nucleotídeos de guanina (GTP / GDP). As

proteínas ARH podem ser mantidas no estado inativo vinculados a GDP e/ ou associadas a inibidores da dissociação do GDP, como ARHGDIA (*Uniprot*, 2011).

O gene *ARHGDIA* (*Rho GDP dissociation inhibitor/ alpha*), está localizado no cromossomo 17q25.3, enquanto o gene *ARHGDIB* (*Rho GDP dissociation inhibitor/ beta*) em 12p12.3. Os genes pertencem à família das GDIs e tem um importante papel no crescimento celular normal. Codificam proteínas regulatórias que atuam primariamente controlando atividades de Rho-GTPases. A sinalização aberrante destas moléculas é comumente observada em alta porcentagem de cânceres humanos, e tem sido envolvida em praticamente todos os aspectos do fenótipo maligno, como: aumento da proliferação de células tumorais, promoção da angiogênese e aquisição de atividades metastáticas e invasivas (ZHANG, 2006). A maioria das Rho GTPases alterna entre a forma ativa (GTP-ligado) e inativa (GDP-ligado), em ciclo regulado por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e GAPs (*GTPase activating proteins*), além das GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) (HEASMAN & RIDLEY, 2008).

A super expressão de RhoGDI em várias linhagens celulares induz a ausência de função das actinas do citoesqueleto e a perda da aderência ao substrato. É super expressa em diversos tipos de cânceres humanos; incluindo os mamários. Também foram observados altos níveis de expressão de RhoGDI em linhagens celulares quimioresistentes, sugerindo que esta proteína desempenha um papel importante de resistência a drogas, protegendo as células cancerosas contra apoptose induzidas por diferentes agentes quimioterápicos (ZHANG *et al.*, 2005).

O Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA), codificado pelo gene GDI1 localizado no cromossomo Xq28, também são capazes de regular a reação de troca GDP-GTP de membros da família Rab, pequenas proteínas ligantes de GTP na superfamília Ras. GDIs diminuem a taxa de dissociação do GDP a partir de proteínas Rab, liberando o GDP de proteínas Rabs ligadas à membrana. GDI1 é expresso principalmente em tecidos neurais e sensoriais e estão envolvidas no tráfico de moléculas em vesículas, entre organelas celulares. Mutações no GDIA têm sido associadas a retardo mental inespecífico associado ao cromossomo X (*Uniprot*, 2011). Uma relação direta com o desenvolvimento do câncer de mama não foi estabelecida.

A família 14-3-3 é composta por proteínas diméricas, altamente conservadas, encontradas em plantas e mamíferos, codificadas por sete genes distintos em

mamíferos (alfa/ beta, épsilon, eta, gama, tau/ teta, zeta/ delta e sigma) e estão presentes em praticamente todos os tecidos. Entre as proteínas identificadas, 14-3-3 gama é codificada pelo gene *YWHAG* (*tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide*), localizado no cromossomo 7q11.23. É induzida por fatores de crescimento humano em células musculares lisas e também é altamente expressa no músculo esquelético e no coração, sugerindo um papel importante desta proteína no tecido muscular. Apresenta associação com RAF1 e proteína quinase C, envolvidas em vias diferentes de transdução de sinal. A proteína 14-3-3 teta é codificada pelo gene *YWHAQ*, localizado em 2p25.1. A proteína 14-3-3 zeta/ delta é codificada pelo gene *YWHAZ*, no cromossomo 8q23.1. Esta última, interage com a proteína IRS1, sugerindo um papel na regulação da sensibilidade à insulina (*Uniprot*, 2011).

Uma característica deste grupo é a capacidade de se ligarem com proteínas fosforiladas em resíduos de serina e treonina, além de moléculas sinalizadoras incluindo quinases, fosfatases, e receptores transmembrana. Esta interação com outras proteínas faz com que proteínas da família 14-3-3 desempenhem um papel importante nos processos regulatórios, como: transdução de sinal, divisão celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose, e câncer. As proteínas da família 14-3-3 apresentam ainda um efeito inibitório sobre a progressão do ciclo celular, mantendo, direta ou indiretamente, a ciclina-dependente de quinase Cdc2 em uma forma inativa, impedindo a progressão da fase G2-M. Também estimulam o fator de transcrição p53, resultando na inibição da transição da fase G1-S (HEMERT *et al.*, 2001).

O gene *GRB2*, localizado no cromossomo 17q25.1, codifica a Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento (GRB2). Esta proteína se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico e apresenta um domínio SH2 e dois domínios SH3. O receptor do fator de crescimento ligado a proteína homologia Src 2 (SH2 Grb2) desempenha um papel importante na via de sinalização de Ras e Akt, que envolve a proliferação e a diferenciação celular. Antagonistas de SH2-Grb2 tornam-se alvos potenciais para o desenvolvimento de agentes anticarcinogênicos. Peptídeos com alta afinidade para o domínio Grb2-SH2 foram elaborados e testados quanto seu efeito antiproliferativo em células humanas de câncer de mama, sua especificidade para células cancerosas, e seus efeitos sobre a citotoxicidade e sobre o ciclo celular. Estes resultados fornecem informações importantes para o

desenvolvimento de agentes anti-câncer (McDONALD *et al.*, 2008), . Apesar de ser um fator central na sinalização mitogênica e um alvo para intervenção terapêutica, o papel de oligomerização Grb2 na sinalização celular não é bem compreendida. Modelos estruturais 3D de dímeros e monômeros Grb2 sugerem que o rearranjo conformacional, mediante simples dimerização pode surgir a partir de trocas nos domínio (CHEN *et al.*, 2010). O mesmo estudo fornece insights sobre o papel da Grb2 como um adaptador no circuito de sinalização celular e como dimerização Grb2 pode apresentar alta fidelidade na transdução de sinal, bem como levar a uma amplificação de sinal rápida mediante a estimulação de receptores.

A Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B), é uma das três subunidades catalíticas da proteína fosfatase 1 (PP1). PP1 é o principal tipo de serina/treonina fosfatase codificada pelo gene *PPP1CB* e apresenta peso molecular de 37 kDa. Está envolvida na regulação de uma variedade de processos celulares do ponto de vista genético, farmacológico e bioquímico. Atuam em vias de sinalização celular reguladas por fosforilação/ desfosforilação de proteínas. A adição ou remoção do grupamento fosfato de uma proteína pode gerar um reconhecimento para interação proteína-proteína, o controle da estabilidade protéica e, o mais importante, modular atividade de enzimas. Mutações em PP1 levam a defeitos na mitose, meiose, integridade celular, metabolismo do glicogênio, contração muscular e síntese de proteínas. A importância de proteínas fosfatases na regulação de vários eventos celulares sugere a utilização das mesmas como alvos terapêuticos para a descoberta de novas drogas. No entanto, a inibição das mesmas pode ser inespecífica e, portanto, apresentar efeito sistêmico (AOYAMA *et al.*, 2003).

7.5.9 Degradação protéica

Constituíram 5,44% do total de proteínas identificadas. Foram analisados oito *spots* e cinco proteínas diferentes foram encontradas. As proteínas identificadas nesta categoria foram: Aminopeptidase citosólica (AMPL), Catepsina D (CATD); Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1) , Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2); e Ubiquitina tioesterase (OTUB1). As

maquinarias de degradação de proteínas atuam como suporte essencial para manter a homeostase celular.

Aminopectidase citosólica (AMPL) é codificada pelo gene *LAP3*, localizado no cromossomo 4p15.32. AMPL constitui uma enzima dependente de zinco, da classe das hidrolases, que catalisa a remoção de aminoácidos N-terminais da maioria dos peptídeos, particularmente aqueles com resíduos de leucina na região N-terminal, exceto aqueles com resíduos de lisina e arginina. Este processo ocorre no citosol celular dos tecidos, com atividade elevada no duodeno, fígado e rim. A relação desta proteína com o câncer não foi descrita.

O gene *CTSD* codifica uma protease lisossômica, a Catepsina D (CATD), composta de um dímero dissulfeto de cadeias ligadas, pesada e leve. A transcrição deste gene tem início a partir de diversos sítios, incluindo o local de partida para um transcrito regulado por estrogênio. Mutações nesse gene estão envolvidos na patogênese de várias doenças, incluindo câncer de mama e, possivelmente, a doença de Alzheimer. A função biológica primária de catepsina D enzimaticamente ativa é a degradação protéica em meio ácido de lisossomos. A falha dessa função pode resultar no acúmulo de lipofuscina em diversos tipos de células, neurodegeneração, a regressão do desenvolvimento e perda visual. Pro-catepsina D, secretada pelas células tumorais, atua como mitógeno e estimula as células do estroma em suas propriedades pro-invasivas e pro-metastáticas. Os níveis de pro-cathepsin D / catepsina D representam um fator prognóstico independente em uma variedade de cânceres. Foram observados níveis no soro de pro-catepsina D de 5% em pacientes com câncer de mama comparado a 3% em controles saudáveis. Cathepsin D não apresenta potencial para o diagnóstico de carcinomas da mama quando examinado isoladamente, no entanto, pode, eventualmente, mostrar potencial para o diagnóstico quando incorporado a ensaios associados a outros antígenos tumorais (PIURA & PIURA, 2010).

A Ubiquitina tioesterase (OTUB1) é codificada pelo gene *OTUB1*, localizado no cromossomo 11q13.1. É um membro da superfamília de OTU (tumor de ovário) da classe de cisteínas proteases. A proteína codificada é uma ubiquitina-peptidase altamente específica, que se une a ubiquitina de cadeia (poli) ramificada, mas não a partir de substratos ubiquitilados. Interage, também, com outra protease ubiquitina e uma ubiquitina E3 ligase que inibe a transcrição de genes de citocinas no sistema

imune. Atua vias específicas de dependente de ubiquitina, possivelmente através de uma função de edição para o crescimento da cadeia poliubiquitina (*Uniprot*, 2011).

Em geral, na via da ubiquitina, as proteínas são degradadas por um complexo de protease 26S (também designado por proteossoma) que reconhece as proteínas a ser degradadas pela presença de ubiquitina nestas. A ubiquitina é uma proteína, presente em todas as células eucarióticas, que possui um importante papel na marcação de proteínas para a sua degradação. Três enzimas (E_1 , E_2 e E_3) participam na conjugação de ubiquitina às proteínas. Inicialmente, a enzima E_1 liga-se à ubiquitina tornando-a ativa. A ubiquitina ativada é então ligada à enzima E_2 e posteriormente à enzima E_3 que catalisa a transferência da ubiquitina para a proteína-alvo. Esta proteína ubiquitinada é depois digerida por um complexo de protease 26S. Esta protease energizada por ATP poupa a ubiquitina, que é reciclada, desdobra a proteína e digere-a (SIJTS & KLOETZEL, 2011).

O Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1) e o Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2), são codificados pelos genes *PSME1* e *PSME2*, ambos localizados no cromossomo 14q12. O proteossoma 26S é um complexo proteinase multicatalítico com uma estrutura altamente ordenada composta de 2 complexos, um núcleo 20S e um regulador 19S. Os proteossomas estão distribuídos por todas as células eucarióticas em alta concentração e atuam degradando peptídeos em um processo dependente de ATP / ubiquitina em uma via não-lisossomal. Uma função essencial do proteossoma modificado, os imunoproteossomas, é a transformação de peptídeos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Os imunoproteossomas contém um regulador alternativo, conhecido como o regulador 11S ou PA28, que substitui o regulador 19S. Três subunidades (alfa, beta e gama) do regulador 11S foram identificados. O gene *PSME1* codifica a subunidade alfa do regulador 11S, enquanto o gene *PMSE2* codifica a subunidade beta do regulador 11S, induzidas pelo interferon-gama. No final, três subunidades alfa e beta se combinam para formar um anel heterohexamérico (*Uniprot*, 2011). Para desencadear uma resposta imune, receptores de células T precisam visualizar um epítopo na superfície da célula, apresentado pelo MHC. Embora ainda haja muito para ser elucidado a respeito da inter-relação do sistema imunológico com o câncer, os conhecimentos atuais sobre a resposta imune e anticorpos tumorais, criam amplas perspectivas de ação no

sistema imunológico e na antigenicidade tumoral, com potencial para auxiliar no diagnóstico e terapia de diversas neoplasias (WEINBERG, 2008).

7.5.10 Detoxificação e proteínas redox

Compreendem 2,72% do total de proteínas identificadas. Neste grupo estão incluídas, em quatro bandas, quatro enzimas identificadas como: Peroxiredoxina 1 (PRDX1), Peroxiredoxina 4 (PRDX4), Peroxiredoxina 6 (PRDX6) e Glutathione S-transferase P (GSTP1). As proteínas de detoxificação e proteínas redox são enzimas que assumem papéis fundamentais relacionados ao catabolismo celular e regulação da homeostase celular e do organismo. Uma série de evidências experimentais sugere que o estresse oxidativo medeia várias respostas celulares e, por sua vez, o controle de redução / oxidação (redox), fundamental na manutenção de processos metabólicos do organismo (DONG-YOUNG *et al.*, 2001).

A família peroxiredoxina (PRDX) é constituída por enzimas antioxidantes, que reduzem o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de alquila de água e álcool, com a utilização de equivalentes redutores derivados de tiol. A Peroxiredoxina 1 (PRDX1) é codificada pelo gene PRDX1, localizado no cromossomo 1p34.1. Esta proteína desempenha um papel antioxidante protetor das células e pode contribuir para a atividade antiviral de células de linfócitos T CD8 (+). Pode apresentar ainda um efeito proliferativo e desempenhar um papel importante na origem e progressão de neoplasias. A Peroxiredoxina 4 (PRDX4) é codificada pelo gene *PRDX4*, localizado no cromossomo Xp22.11. Esta proteína apresenta um papel regulatório na ativação do fator de transcrição NF-kappaB. Outra proteína identificada, a Peroxiredoxina 6 (PRDX6) é codificada pelo gene 1q25.1, localizado no cromossomo 1q25.1. Esta proteína é uma enzima bifuncional com dois sítios ativos distintos, um membro da família de proteínas tiol-específica antioxidante. Está envolvida na regulação redox da célula, que reduz hidroperóxidos de cadeia curta, ácidos graxos e fosfolípidios. Pode desempenhar um papel na regulação do volume de fosfolípidios, bem como na proteção contra lesões oxidativas (*Uniprot*, 2011).

Nos últimos anos, o sistema peroxiredoxina tem recebido maior atenção por sua eficiência antioxidante. A família PRDX tem seis membros distintos localizados

no citoplasma e em vários locais subcelulares, incluindo peroxissomos e mitocôndrias, e desempenha funções relevantes no controle da sinalização celular (DONG-YOUNG *et al.*, 2001). Alguns dos membros do PRDX também apresentam efeitos sobre a diferenciação celular e apoptose e foram encontrados superexpressos no câncer de mama. A expressão de peroxirredoxinas aumentada em neoplasias de mama sugere a indução de PRDX como resposta ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em tecidos tumorais (KARIHTALA *et al.*, 2003).

A Glutathione S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas que desempenham um papel importante na detoxificação, catalisando muitos compostos hidrofóbicos e eletrofílicos com a glutathione reduzida. Com base na função bioquímica, imunológica, e nas propriedades estruturais, as GSTs solúveis são classificadas em quatro classes principais: alfa, mu, pi, e teta. A proteína Glutathione S-transferase P (GSTP1) é codificada pelo gene polimórfico *GSTP1* (*glutathione S-transferase pi 1*), localizado no cromossomo 11q13. É essencial para o metabolismo de xenobióticos e desempenha um papel na susceptibilidade ao câncer e outras doenças. Estrógenos e componentes químicos ambientais atuam como potenciais carcinógenos e desempenham um papel importante na gênese e progressão do câncer de mama. Assim, os polimorfismos dos genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de estrogênio e na ativação metabólica de pró-carcinógenos e intermediários genotóxicos, como o citocromo P450 (CYP17), e sistemas endógenos de eliminação de radicais livres, como a glutathione S-transferase (GSTP1) pode influenciar a susceptibilidade individual ao câncer de mama. A expressão aumentada do gene *GSTP1* tem sido associada com a transformação maligna, resistência às drogas antitumorais e diminuição da sobrevivência (ANTOGNELI *et al.*, 2009).

7.5.11 Proteínas com atividade extracelular

Constituíram 12,24% do total de proteínas identificadas neste trabalho. Em 18 spots foram encontrados 10 proteínas distintas. Entre elas: Alfa-1 antitripsina (A1AT); Apolipoproteína A-I (APOA1); Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB); Cadeia 2

Ig lambda, região C (LAC2); Interleucina 6 (IL6); Proteína CYR61 (CYR61); Serotransferrina (TRFE); Serpina B9 (SPB9); Vitronectina(VTNC); Zinco-alfa-2-glicoproteína (ZA2G).

A proteína Alfa-1 antitripsina (A1AT) é codificada pelo gene *SERPINA1* (*serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1*), localizado no cromossomo 14q32.1. A1AT é membro da superfamília de proteínas denominada SERPINAS (inibidores de protease serina) e desempenha um papel central na regulação de processos proteolíticos. A proteína é um inibidor de serina protease, incluindo elastase, plasmina, trombina, tripsina, quimotripsina, e ativador de plasminogênio. Estudos recentes têm sugerido que a deficiência de A1AT está associada ao aumento do risco de desenvolver diferentes tipos de neoplasia. A diminuição dos níveis desta proteína pode induzir atividade protease serina, aumentando assim o desprendimento de células malignas de seus locais de origem. Pode também atuar na regulação da proliferação, inibição da apoptose e citotoxicidade dos linfócitos (HAMRITA *et al.*, 2009). A Serpina B9 (SPB9) é codificada pelo gene *SERPINB9*, localizado no cromossomo 6p25.2. SPB9 também pertence à superfamília de SERPINAS, capazes de se ligar e inativar serinoproteinases. Essas interações estão envolvidas em muitos processos celulares, incluindo coagulação, fibrinólise, fixação de complemento, remodelação da matriz e apoptose (*Uniprot*, 2011).

A Apolipoproteína A-I (APOA1) é codificada pelo gene *APOA1*, localizado no cromossomo 14q32.13. Este gene está intimamente ligado com outros dois genes da apolipoproteína no cromossomo 11. A proteína APOA1 é o componente principal da lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma. Promove o efluxo do colesterol dos tecidos para o fígado, para que ocorra a excreção, e atua como co-fator para a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), responsável pela formação de ésteres de colesterol no plasma. Alterações neste gene estão associados a distúrbios graves de HDL no organismo, incluindo a doença de Tânger e amiloidose sistêmica não-neuropática (*Uniprot*, 2011). *Huang et al.* (2006) observaram uma diminuição na expressão de APOA1 no soro de pacientes com câncer de mama, comparado a indivíduos controle, e sugerem ainda a avaliação desta proteína como um possível biomarcador tumoral.

A Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB) é codificada pelo gene *FGB*, localizado no cromossomo 4q31.3. Constitui o componente beta do fibrinogênio, uma glicoproteína presente no sangue composta de três pares de cadeias polipeptídicas

não idênticas. Após uma lesão vascular, o fibrinogênio é clivado pela trombina para formar fibrina, o componente mais abundante de coágulos sanguíneos. Além disso, vários produtos de clivagem do fibrinogênio e fibrina regulam a adesão celular, vasoconstrição e atividades quimiotáticas e mitogênicos de vários tipos de células. Mutações no gene *FGB* resultam em diversas doenças, incluindo afibrinogenemia, disfibrinogenemia, hipodisfibrinogenemia e aumenta a tendência a trombozes. *Cortesi et al.* (2009) verificaram uma diminuição da expressão de FIBB em fluido aspirado de tumores de mama, quando comparados a tecidos mamários não tumorais. A proteína FIBB, entre outras quantitativamente avaliadas, foi selecionada como possível candidata a biomarcador em carcinomas mamários.

A Interleucina 6 (IL6) é codificada pelo gene *IL6*, localizado no cromossomo 7p15.3. É uma citocina que atua na inflamação e na maturação de células B. A proteína é produzida principalmente em locais de inflamação aguda e crônica, onde é secretada no soro e induz uma resposta inflamatória através da transcrição dos receptores de IL6. O funcionamento deste gene está envolvido em uma grande variedade de doenças associadas à inflamação, incluindo a susceptibilidade ao diabetes mellitus e artrite reumatóide juvenil sistêmica, além de estar implicado na tumorigênese. Tumores sólidos desenvolvem hipoxia, como resultado do fornecimento de O₂ inadequada. Curiosamente, os tipos de tumor com aumento dos níveis de hipóxia são conhecidos por ter maior resistência à quimioterapia, bem como o aumento do potencial metastático. Sob condições de hipóxia (1,5% de O₂), as células do câncer de mama secretam altos níveis de IL-6, que servem para ativar e atrair células progenitoras mesenquimais. IL6 atua de forma parácrina sobre essas células estimulando a ativação das vias de sinalização MAPK e Stat3, e aumentando o potencial migratório e as condições de sobrevivência das células (RATTIGAN *et al.*, 2010).

A Proteína CYR61 (CYR61) é codificada pelo gene *CYR61*, localizado no cromossomo 1p22.3. A CYR61 é uma proteína rica em cisteína ligante de heparina que se liga a múltiplos receptores de integrinas, podendo estar presente no citosol e/ou associada à membrana celular e à matriz extracelular de células mesenquimais e epiteliais. Atua na adesão celular, no estímulo à migração celular e angiogênese, e na síntese de DNA, operando como fator de crescimento promotor da proliferação fibroblástica e de células endoteliais, bem como no estímulo da condrogênese em células mesenquimais. CYR61 também promove a adesão das células endoteliais

através da interação com a integrina e aumenta a indução do fator de crescimento e a síntese de DNA. Durante a carcinogênese ocorrem várias modificações na expressão de proteínas, como a CYR61, envolvida na proliferação celular e na angiogênese. Foi demonstrado o aumento da expressão da CYR61 em adenocarcinomas mamários de mulheres e seu possível envolvimento em tumores mediados por estrógenos. A avaliação da expressão da CYR61 em neoplasias mamárias de mulheres apresenta valor prognóstico, pois essa proteína é um fator pró-angiogênico e regulador do crescimento, e o aumento da sua expressão indica maior grau de malignidade, permitindo que a evolução clínica da neoplasia seja prevista, como a possibilidade de recidivas ou a sobrevida da paciente não tratada (SAMPATH *et al.*, 2001).

A Serotransferrina (TRFE), codificada pelo gene *TF*, é uma glicoproteína com peso molecular aproximado de 76,5 kDa. A sua origem é resultado de um evento de duplicação gênica que levou à geração de homólogos C e domínios N-terminais, cada uma ligada a um íon férrico. A função desta proteína é o transporte de ferro do intestino, sistema reticuloendotelial, e de células do parênquima hepático para todas as células em proliferação no organismo. Esta proteína também pode ter uma função fisiológica importante associada a granulócitos / proteína de ligação do pólen (GPBP), envolvidos na remoção de matéria orgânica de determinados alérgenos do soro. Evidências destacam ainda a relação entre inflamação e câncer, em especial o câncer de mama. De particular interesse, estudos sugerem uma ligação entre inflamação e o metabolismo do ferro em tumores. Acredita-se que a homeostase do ferro, quando desregulada, pode constituir a base para um microambiente inflamatório no tecido mamário, direcionando células ductais / estromais para uma transformação pré-maligna e evolução do câncer de mama (MANELLO *et al.*, 2011).

A Vitronectina (VTNC) é uma proteína da família das pexinas codificada pelo gene *VTN*, localizado no cromossomo 17q11.2. A vitronectina é uma glicoproteína de 75 kDa, composta por 459 resíduos de aminoácidos. É uma proteína secretada e existe em qualquer forma de cadeia simples ou clivada, que formam duas cadeias unidas por uma ligação dissulfeto. É encontrado no plasma sanguíneo e na matrix extracelular, no soro e em diversos tecidos, atuando na promoção da adesão celular e se ligando a várias serpinas inibidoras de proteases. Apresenta papel na homeostase e na formação de tumores. A vitronectina contém uma sequência RGD

que serve como sítio de ligação de integrinas da membrana, que serve para ancorar as células na matrix extracelular. O domínio somatomedina B interage com o receptor de urocinase. Esta interação tem sido associada à migração celular e transdução de sinal. Altos níveis plasmáticos de PAI-1 e do receptor de urocinase, estão relacionados com prognósticos desfavoráveis em pacientes com câncer de mama. A adesão e migração celular estão diretamente envolvidas em processos de invasão e metástase.

A proteína *Zinco-alfa-2-glicoproteína (ZA2G)* é codificada pelo gene *AZGP1*, localizado no cromossomo 7q22.1. Os intervalos de mais de 9,7 kb do gene, e sua organização e seqüência de nucleotídeos são muito semelhantes aos dos primeiros quatro exons dos genes MHC de classe I. No entanto, o gene *AZGP1* não apresenta a informação de codificação para domínios transmembrana e citoplasmáticos típicos dos genes MHC, consistente com a sua presença em diferentes fluidos fisiológicos e patológicos como uma proteína solúvel. Além disso, contém uma elevada densidade de seqüências repetitivas, incluindo seqüências Alu, MER, e elementos MIR, ausentes em genes equivalentes MHC de classe I. Finalmente, a sua região 5'-flanqueadora não apresenta o complexo regulador do gene MHC de classe I, uma seqüência característica. Estes dados podem explicar o padrão de expressão diferente de *AZGP1* e genes MHC de classe I nos tecidos humanos. O genoma humano contém também um suposto pseudogene isolado e caracterizado parcialmente. Este pseudogene apresenta uma organização exon-intron idêntica à do gene funcional, mas apresenta duas mutações deletérias no terceiro exon que determinam o surgimento de códons de parada prematura. A glicoproteína humana ZA2G apresenta função importante no transporte de substâncias e em processos de reconhecimento intercelular. Estimula a degradação de lipídios em adipócitos e causa perdas extensas de gordura, associada a alguns carcinomas avançados. Esta proteína está presente em diversos fluidos biológicos e é produzida em subtipos específicos de câncer de mama (FREIJE *et al.*, 1993).

A Cadeia 2 Ig lambda, região C (LAC2), uma cadeia leve de imunoglobulina, é codificada pelo gene *IGLC2*, localizado no cromossomo 22q11.2. O RNAm é traduzido no citoplasma e a proteína é transportada pelo lúmen do retículo endoplasmático. As imunoglobulinas consistem em dois tipos de cadeias polipeptídicas, uma cadeia leve (L) e uma cadeia pesada (H). As imunoglobulinas são enoveladas em domínios compactos, cada um com função molecular distinta,

além disso, estes domínios assemelham-se uns aos outros em estrutura terciária, sugerindo uma cobertura peptídica comum. A recombinação, entretanto, permite produzir uma extraordinária diversidade de anticorpos a partir de uma quantidade relativamente pequena de DNA codificador. As moléculas de imunoglobulinas, glicoproteínas, são produzidas pelos plasmócitos em resposta a um imunógeno e funcionam como anticorpos. Ainda há muito a ser elucidado a respeito da relação do sistema imune com o câncer, no entanto, seu envolvimento em diversas neoplasias é (WEINBERG, 2008).

7.5.12 Outras funções

Constituiu 0,68% do total de proteínas identificadas, sendo uma banda correspondente a uma proteína: Ferritina, cadeia leve (FRIL). O gene *FTL* codifica a subunidade luz da proteína Ferritina (FRIL), importante para o armazenamento intracelular de ferro em procariotos e eucariotos. O acúmulo de ferro intracelular protege a célula dos efeitos tóxicos do metal livre constituindo uma reserva rapidamente disponível. A proteína é composta por 24 subunidades de cadeias de ferritina, leves e pesadas. Variações na composição das subunidades de ferritina podem alterar as taxas de captação e liberação de ferro em diferentes tecidos (*Uniprot*, 2011). FRIL está presente em todas as células, especialmente naquelas envolvidas na síntese de compostos que contêm ferro, como os precursores eritróides, e no metabolismo e reserva do ferro, em hepatócitos e macrófagos. A ferritina pode ser encontrada sob a forma de depósitos intracitoplasmáticos, inclusões lisossômicas ou como aglomerados visíveis ao microscópio. A maior concentração no organismo encontra-se no fígado e no retículo de células do sistema endotelial do fígado, baço e medula óssea; quantidades menores encontram-se no coração, pâncreas, rins e no soro humano.

A ferritina se eleva em resposta a infecções, traumatismos e inflamações agudas. Seus níveis aumentam com o excesso de ferro, em pacientes transfundidos e em neoplasias, especialmente leucemias e linfomas e nos carcinomas de mama, fígado, pulmão, cólon e próstata. Defeitos no gene da cadeia leve de ferritina também estão associados a diversas doenças neurodegenerativas e a doença

ocular hiperferritinemia-catarata. *Ricolleau et al.* (2006), identificaram a cadeia leve de ferritina (FRIL), utilizando SELDI-TOF-MS e, posteriormente, confirmaram a expressão diferencial da proteína por análises de *Western blot* e imunohistoquímica. O perfil da proteína mostrou claramente uma expressão diminuída em subgrupos de pacientes com carcinomas mamários / linfonodos negativos, associados, neste caso, a um bom prognóstico no câncer de mama.

7.5.13 Queratinas do citoesqueleto

Constituíram 24,49% das proteínas identificadas neste trabalho, sendo 36 bandas e oito proteínas diferentes encontradas. As queratinas do citoesqueleto ou citoqueratinas (CKs) são proteínas específicas que compõem uma parte essencial do citoesqueleto. Como subgrupo particular de 'Citoesqueleto e Proteínas Associadas' presente na classificação proposta, as CKs podem ser encontradas em diferentes tipos de tecidos e constituem contaminantes comuns em análises proteômicas. A contaminação pode ocorrer em todo o processo da técnica, desde o preparo do extrato, focalização isoelétrica, eletroforese bidimensional, como no armazenameto dos géis e em espectrometria de massa. A presença de cada variante deve ser avaliada com cautela, o que justifica uma análise detalhada do grupo antes de sua inserção na classificação proposta por *Minafra et al.* (2006) em 'Citoesqueleto e Proteínas Associadas'.

As CKs formam um grupo de proteínas dos filamentos intermediários encontradas em grande quantidade nas células epiteliais e são essenciais para o desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular. Os filamentos intermediários são constituídos de proteínas que formam uma parte importante do citoesqueleto e fornecem topologia às células e tecidos. Essa estrutura intrínseca apresenta propriedade de auto-organização e capacidade de responder a estímulos externos. São altamente dinâmicas, variando continuamente em resposta a diversos estímulos celulares, submetidas a processos reversíveis de desmontagem e remontagem. Não apenas ocorrem diferenças no nível de expressão de proteínas do citoesqueleto durante processos de apoptose, proliferação, diferenciação e

reversão tumoral, mas também há redistribuição e reorganização dessas proteínas no interior das células (EFFENBERGER *et al.*, 2010).

Cerca de 20 diferentes tipos de CKs já foram identificadas, codificadas por genes em duas regiões distintas, 17q21.2 e 12q13.13, e classificadas respectivamente como heterodímeros compostos por uma proteína ácida menor, tipo I (CKs 9 a 20), e outra básica maior, tipo II (CKs 1 a 10). As CKs catalogadas apresentam numeração específica de acordo com valores distintos de peso molecular e ponto isoelétrico. Existe uma clara associação entre CKs do tipo I e do tipo II na formação dos filamentos intermediários e cada célula, individualmente, expressa o seu próprio tipo de queratina I e II. A composição desses pares de CKs pode variar de acordo com o tipo celular e seu grau de diferenciação. As CKs, que apresentam relações bioquímicas e imunológicas de diversos graus, são expressas em diferentes epitélios, em diferentes combinações de polipeptídeos, com pH variando entre 5 e 8, e massa molecular entre 40 a 68 kDa (MOLL, 1994; SCHWEIZER *et al.*, 2006).

Por exemplo, epitélios queratinizados como o encontrado na pele, expressam as CKs 1, 2 e 10, porém as mesmas também podem ser encontradas em epitélios não queratinizados. As CKs 3 e 12 somente são encontradas na córnea humana. Os epitélios pavimentosos não queratinizados expressam as variantes 4 e 13, sendo as CKs 5, 14 e 15 encontradas na camada basal de todos os epitélios estratificados nos queratinócitos que compõem os folículos pilosos. As CKs 6 e 16 são observadas nas células epiteliais em estado de hiperproliferação, como exemplo observado em tecido tumorais (EFFENBERGER *et al.*, 2010).

Foram observados 8 tipos distintos de queratina: Queratina do citoesqueleto 1, tipo II (K2C1); Queratina do citoesqueleto 3, tipo II (K2C3); Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7); Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8); Queratina do citoesqueleto 9, tipo I (K1C9); Queratina do citoesqueleto 10, tipo I (K1C10); Queratina do citoesqueleto 16, tipo I (K1C16); Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19). Algumas vezes, mais de um tipo de citoqueratina foi observado na mesma banda excisada. Entre os resultados protéicos analisados, contudo, a comparação do perfil de MM e pl não se mostraram correspondentes em K2C1 e K2C3, prováveis contaminantes. K1C9, K1C10 e K1C16 diferiram quanto a MM esperada e observada. As proteínas K2C7, K2C8 e K1C19 apresentaram valores significativos de MM e pl nos géis.

Entre as CKs do tipo I identificadas, a proteína K1C9 constitui uma cadeia de filamentos intermediários expressos principalmente na epiderme terminal diferenciada das palmas das mãos e solas de pés. Mutações nesse gene causam queratoderma epidermolítica palmoplantar. A citoqueratina K1C10 é uma proteína de função estrutural que forma os filamentos intermediários e, juntamente com os microfilamentos de actina e microtúbulos, compõem o citoesqueleto das células epiteliais. Mutações nesse gene estão associadas com hiperqueratose epidermolítica. K1C16 está associado a expressão da queratina 14 em uma série de tecidos epiteliais, incluindo o esôfago, língua e folículos pilosos (*Uniprot*, 2011). A relação destas citoqueratinas com o desenvolvimento de tumores mamários não foi descrita.

A Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19) é codificada pelo gene *KRT19*, localizado no cromossomo 17q21.2, junto a outros membros da família de citoqueratinas tipo I (Disponível em <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Overview?db=core;g=ENSG00000171345;r=17:38497366-40192669>). A proteína foi identificada neste trabalho em 10 bandas entre os géis analisados, com valores observados de MM entre 42.00 e 43.00 e pI 4.74 e 5.43, próximo ao esperado de 44.08 kDa e pI igual a 5.04. Ao contrário de seus familiares relacionados esta citoqueratina não se associa a outras citoqueratinas em células epiteliais. É especificamente expressa na periderme e na epiderme transitória, em desenvolvimento. A proteína K1C19 está presente no tecido mamário normal e tumoral, no entanto, um aumento na regulação da expressão do gene *KRT19* pode contribuir para a reorganização do citoesqueleto e da matriz celular, elevando o seu potencial metastático (RAMOT *et al.*, 2009; JOHANN JR. *et al.*, 2009).

As CKs do tipo II observadas neste trabalho, K2C7 e K2C8, são proteínas básicas ou neutras, dispostas em pares de cadeias de queratina heterotípicas durante a diferenciação e estratificação de tecidos epiteliais. K2C7 é expressa especificamente no epitélio simples que reveste as cavidades dos órgãos internos e nos ductos das glândulas e vasos sanguíneos. O splicing alternativo pode resultar em variantes diversas de transcrição, no entanto, nem todas as variantes foram plenamente descritos. O produto do gene *KRT8*, a proteína K2C8 normalmente dimeriza com a queratina 18 para formar um filamento intermediário simples de uma única camada de células epiteliais (*Uniprot*, 2011). Esta proteína desempenha um papel na manutenção da integridade estrutural celular e também funciona na transdução de sinal e diferenciação celular. A relação entre alterações nesta

proteína e o câncer de mama do tipo luminal já está estabelecida (Cf. TRASK *et al.*, 1990; JING *et al.*, 1996; WALKER *et al.*, 2007; EFFENBERGER *et al.*, 2010). Os genes que codificam as citoqueratinas tipo II localizam-se em 12q13.13 (Disponível em <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?ftype=ProteinAlignFeature;id=P12035;r=12:51497035-54736686>).

A expressão alterada de genes que codificam citoqueratinas está relacionada com a transformação neoplásica. Alguns trabalhos sugerem que a expressão de citoqueratinas permanece conservada durante a tumorigênese, permitindo a discriminação imunofenotípica de células basais/ mioepiteliais e luminais. Os genes *KRT5*, *KRT6*, *KRT14* e *KRT17* são observados na maioria dos filamentos intermediários de células mioepiteliais em tecido mamário normal, enquanto *KRT8*, *KRT18* e *KRT19* são característicos de células de carcinomas mamários do tipo luminal. As alterações na expressão dos subtipos de citoqueratinas podem se constituir como marcador histopatológico, fornecendo informações relevantes sobre diferenciação e origem dos carcinomas e auxiliando no diagnóstico diferencial entre carcinomas primários e metastáticos (EFFENBERGER *et al.*, 2010; KORDEK *et al.*, 2010).

O alto grau de especificidade tecidual apresenta-se como a principal característica das CKs, que além de ser o maior componente do citoesqueleto das células epiteliais, possuem padrão típico de expressão nos tecidos epiteliais normais. De acordo com o tipo de tecido epitelial e estado de diferenciação celular, a expressão dessas proteínas pode sofrer variações. O estudo das alterações epiteliais em estados patológicos, tem se baseado no conjunto de características apresentadas pelas CKs, onde o alto grau de conservação e resistência a degradação, aliados a expressão e antigenicidade, tornam-se relevantes para o diagnóstico diferencial entre as neoplasias de origem epitelial (EFFENBERGER *et al.*, 2010).

7.6 Considerações Finais

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea. O aumento da compreensão da biologia deste câncer levou a avanços clínicos

significativos no seu tratamento, principalmente devido ao desenvolvimento diagnóstico que permite a sua detecção precocemente. A identificação de marcadores prognósticos moleculares confiáveis para se estimar o risco de recorrência e progressão tumoral é de grande importância, por contribuir para decisões de terapias adjuvantes e do tratamento pós-operatório.

A caracterização de novos testes moleculares estabelece estratégias individuais, baseadas no perfil genético do tumor de cada paciente, e quando associadas às terapias-alvo tornam os tratamentos mais eficazes e ampliam a expectativa clínica das pacientes. Pesquisas futuras e estudos proteômicos mais detalhados deverão contribuir para a descoberta de eventos iniciais da tumorigênese, bem como estabelecer os mecanismos que controlam a progressão tumoral.

Devido à elevada variedade de proteínas expressas pelo genoma individual, e da complexidade humana em padrões proteômicos, decifrar parte significativa de proteínas complementares ao câncer é ainda uma expectativa distante. A disponibilidade de um mapa de referência detalhado das células de câncer de mama, entretanto, pode ser muito útil para a identificação de possíveis biomarcadores no estudo de modulações proteômicas associadas à progressão do câncer e a novos desenvolvimentos no tratamento farmacológico das neoplasias mamárias.

Este trabalho representa um passo na identificação de proteínas somando informações relevantes a outros trabalhos anteriormente publicados na tentativa de definir perfis proteômicos diferenciais no câncer de mama. A expectativa inicial do trabalho, de certa forma, se cumpre. As proteínas diferencialmente expressas identificadas na análise proteômica comparativa, entre tumores primários de mama e respectivos linfonodos axilares, em sua maioria, podem estar diretamente envolvidas no processo neoplásico. Alterações moleculares na expressão de proteínas funcionais envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação, motilidade, apoptose e sinalização celular podem sugerir potenciais biomarcadores diagnósticos, prognósticos e como alvos terapêuticos. Estudos mais amplos, envolvendo outras metodologias e maior número de amostras, contudo, são necessários e devem contribuir de modo significativo para esclarecer uma associação efetiva do envolvimento de genes e proteínas na carcinogênese mamária, em sua origem e evolução.

8. CONCLUSÃO

2D-PAGE é uma técnica eficiente utilizada para a obtenção de perfis protéicos completos em diferentes tipos de tecidos, incluindo tumores. As vantagens das aplicações de MS incluem ainda a sensibilidade e a rapidez na identificação de proteínas amostras complexas. Com os avanços tecnológicos, não apenas a identificação de peptídeos tem se concretizado; o mapeamento dos produtos protéicos, a construção de estruturas tridimensionais de proteínas, análises funcionais e as possíveis MPTs também atuam como ferramentas valiosas na elucidação de vias envolvidas na origem e progressão tumoral. Apesar da importância desta técnica a mesma deve ser aprimorada e metodologias adicionais devem complementar e validar as proteínas diferenciais obtidas neste trabalho.

Proteínas diferenciais foram observadas tanto nos carcinomas primários de mama como nos linfonodos axilares, sendo mais evidentes quando se comparou as amostras pareadas de ambos os tipos de tumores das sete pacientes. A análise do conjunto dos tumores primários e linfonodos axilares, no entanto, apresentou diferenças menos significativas. Estes resultados observados nos dois tipos de análise são provavelmente devidos a procedimentos metodológicos. Dentre as proteínas identificadas, a maioria apresenta funções associadas a mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese do câncer de mama, como, regulação da divisão e diferenciação celular, organização do citoesqueleto, detoxificação, capacidade de adesão e apoptose, justificando a importância do método na pesquisa do câncer.

Os dados obtidos neste trabalho fornecem informações para estudos subseqüentes correlacionando proteínas diferenciais e o seu envolvimento na evolução de neoplasias, em variações interindividuais e intertumoriais. Entretanto, para uma compreensão mais efetiva da participação destas proteínas no processo carcinogênico é necessário a complementação destes resultados através de novos estudos diferenciais de expressão proteômica, associados também à transcriptômica e genômica. Novas aplicações da proteômica tornam-se relevantes na identificação de potenciais biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e / ou como alvo terapêutico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENDOLA, L.C.B. & VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n° 4, p. 325-330, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Cancer Facts & Figures 2010. Atlanta: American Cancer Society, 2010.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). Disponível em <<http://www.cancerstaging.org/>> Acessado em janeiro de 2011.

ANTOGNELLI, C.; DEL BUONO, C.; LUDOVINI, V.; GORI, S.; TALESA, V.N.; CRINÒ, L.; BARBERINI, F.; RULLI, A. *CYP17*, *GSTP1*, *PON1* and *GLO1* gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1-14, 2009.

AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, v. 26, n° 6, p. 896-900, 2003.

BANKS, R.E.; DUNN, M.J.; HOCHSTRASSER, D.F.; SANCHEZ, J.C.; BLACKSTOCK, W.; PAPPIN, D.J.; SELBY, P.J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **The Lancet**, v. 356, n° 9243, p. 1749-1756, 2000.

BASELGA, J. & SWAIN, S.M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nature Rev Cancer**, v. 9, n° 7, p. 463-475, 2009.

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

BERKELMAN, T. Quantitation of Protein in Samples Prepared for 2-D Electrophoresis. **Methods in Molecular Biology**, v. 424, p. 43-49, 2008.

BERNARDS, R. & WEINBERG, R.A. A progression puzzle. **Nature**, v. 418, n° 6900, p. 823.

BISCH, P. M. Proteômica. In: LUÍS MIR. (Org.). *Genômica*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu. v. 1, p. 139-162, 2004.

BOTTA, D. & JACOBSON, M.K. Identification of a Regulatory Segment of Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase. **Biochemistry**, v. 49, n° 35, p. 7674-7682, 2010.

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

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

BUNZ, F. Principles of Cancer Genetics. Tumor Supressor genes. Biomedical and Life Sciences, p. 77-124, 2008.

BURNS, D.M.; YING, W.; KAUPPINEN, T.M.; ZHU, K.; SWANSON, R.A. Selective Down-Regulation of Nuclear Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase. **PLoS ONE**, v. 4, n° 3, p. 1-6, 2009.

CARRETTE, O.; BURKHARD, P.R.; SANCHEZ, J.C.; HOCHSTRA, D.F. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research, **Nature Protocols**, v. 1, n° 2, p. 812-824, 2006.

CASEY, P.M.; CERHAN, J.R.; PRUTHI, S. Oral Contraceptive Use and the Risk of Breast Cancer. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n° 1, p. 86-91, 2008.

CAVALLI, L.R. Molecular markers of breast axillary lymph node metastases. **Expert Rev. Mol. Diag.**, v. 9, n° 5, p. 441-454, 2009.

CATH. Protein Structure Classification Database. Disponível em <<http://www.cathdb.info/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

CHEN, C.H.; CHEN, M.K.; JENG, K.C.; LUNG, F.D. Effects of peptidic antagonists of Grb2-SH2 on human breast cancer cells. **Protein Pept Lett**, v. 17, n° 1, p. 44-53, 2010.

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.

CHUNG, C.H.; LEVY, S.; CHAURAND, P.; CARBONE, D.P. Genomics and proteomics: Emerging technologies in clinical cancer research. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, p. 1-25, 2007.

COLLISHAW, N.E.; BOYD, N.F.; CANTOR, K.P.; HAMMOND, S.K.; JOHNSON, K.C.; MILLAR, J.; MILLER, A.B.; MILLER, M.; PALMER, J.R.; SALMON, A.G.; TURCOTTE, F. Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk. Ontario Tobacco Research Unit (OTRU), Special Report Series, 2009.

COLNAGO, L.A.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A.P. Espectrometria de Massa e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução no Estudo de Macromoléculas Biológicas. **Química Nova na Escola**, n° 16, p. 1-6, 2002.

CORTESI, L.; BARCHETTI, A.; DE MATTEIS, E.; ROSSI, E.; DELLA CASA, L.; MARCHESELLI, L.; TAZZIOLI, G.; LAZZARETTI, M.G.; FICARRA, G.; FEDERICO, M.; IANNONE, A. Identification of protein clusters predictive of response to chemotherapy in breast cancer patients. **J Proteome Res**, v. 8, n° 11, p. 4916-4933, 2009.

COWAN, M.L. & VERA, J. Proteomics: Advances in biomarker Discovery. **Expert Rev. Proteomics**, v. 5, n° 1, p. 21-23, 2008.

CRAWFORD, N.P.S.; YANG, H.; MATTAINI, K.R.; HUNTER, K.W. The Metastasis Efficiency Modifier Ribosomal RNA Processing 1 Homolog B (RRP1B) Is a Chromatin-associated Factor. **J Biol Chem.**, v. 284, n° 42, p. 28660-28673, 2009.

CROCE, C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature Rev Genetics**, v. 10, p.704-714, 2009.

DE MORENO, M.R.; SMITH, J.F.; SMITH, R.V. Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. **J. Pharm. Sci**, v. 75, p. 907-911, 1986.

DENECKER, G.; OVAERE, P.; VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W. Caspase-14 reveals its secrets. **J Cell Biol**, v. 180, n° 3, p. 451-458, 2008.

DINH, P.; SOTIROU, C.; PICCART, M.J. The evolution of treatment strategies: aiming at the target. **The Breast**, v. 16, p. 10-16, 2007.

DOMINGUEZ-SOLA, D.; YING, C.Y.; GRANDORI, C.; RUGGIERO, L.; CHEN, B.; LI, M.; GALLOWAY, D.A.; GU, W.; GAUTIER, J.; DALLA-FAVERA, R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. **Nature**, v. 448, p. 445-453, 2007.

DONG, Y.; GANTHER, H.E.; STEWART, C.; CLEMENT. Identification of Molecular Targets Associated with Selenium-induced Growth Inhibition in Human Breast Cells Using cDNA Microarrays. **Cancer Research**, v. 62, p. 708-714, 2002.

DONG-YOUNG, N; SOO-JUNG, A; RYUNG-AH, L.; SUNG-WON, K.; IN-AE, P.; HO-ZOON, C. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. **Anticancer Research**, v. 21, n° 3B, p. 2085-2090, 2001.

DRAPER, J.M.; XIA, Z.; SMITH, C.D. Cellular palmitoylation and trafficking of lipidated peptides. **J. Lipid Res.**, v. 48, p. 1873-84, 2007.

DUPONT, A.; CORSEAUX, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A.L.; SUSEN, S.; VINCENTELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, p. 585-596, 2005.

EFFENBERGER, K.E.; BORGAN, E.; EULENBURG, C.Z.; BARTKOWIAK, K.; GROSSER, A.; SYNNESTVEDT, M.; KAARESEN, R.; BRANDT, B.; NESLAND, J.M.; PANTEL, K.; NAUME, B. Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern. **Breast Cancer Res Treat**, v. 125, n° 10, p. 729-738, 2010.

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.

ELLSWORTH, R.E.; SEEBACH, J.; FIELD, L.A.; HECKMAN, C.; KANE, J.; HOOKE, J.A.; LOVE, B.; SHRIVER, C.D. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. **Clin Exp Metastasis**, v. 26, p. 205-213, 2009.

ELSTON, C.W. & ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-410, 1991.

EXPASY. Disponível em <<http://www.expasy.ch/>> Acessado em Janeiro de 2011.

FENG, Y.; SUN, B.; LI, X.; ZHANG, L.; NIU, Y.; XIAO, C.; NING, L.; FANG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CHENG, J.; ZHANG, W.; HAO, X. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, v. 103, n° 3, p. 319-329, 2007.

FLETCHER, G.H.; MONTAGUE, E.; NELSON, A.J. 3rd. Combination of conservative surgery and irradiation for cancer of the breast. **AJR Am J Roentgenol**, v. 126, n° 2, p. 216-22, 1976.

FOUNTOULAKIS, M.; JURANVILLE, J.F.; MANNEBERG, M. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using nonglycosylated and glycosylated proteins. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 24, p. 265-274, 1992.

FREIJE, J.P.; FUEYO, A.; URÍA, J.A.; VELASCO, G.; SÁNCHEZ, L.M.; LÓPEZ-BOADO, Y.S.; LÓPEZ-OTÍN, C. Human Zn-alpha 2-glycoprotein: complete genomic sequence, identification of a related pseudogene and relationship to class I major histocompatibility complex genes. **Genomics**, v. 18, n° 3, p. 575-587, 1993.

FRIZZELL, K.M.; GAMBLE, M.J.; BERROCAL, J.G.; ZHANG, T.; KRISHNAKUMAR, R.; CEN, Y.; SAUVE, A.A.; KRAUS, W.L. Global Analysis of Transcriptional Regulation by Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **J Biol Chem**, v. 284, n° 49, p. 33926-33938, 2009.

GAST, M.C.W.; SCHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H. Clinical proteomics in breast cancer: a review. **Breast Cancer Res Treat**, v. 116, p.17-29, 2009.

GOLDBERGER, N.E. & HUNTER, K.W. A systems biology approach to defining metastatic biomarkers and signaling pathways. **Systems Biology Approach**, v. 1, p. 89-96, 2009.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n° 12, p. 3665-3685, 2004.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. Technical University of Munich. A Laboratory Manual, 2007. Disponível em <http://www.wzw.tum.de/proteomik/2D_Manual-Gorg_2007-short.pdf>

GRAVES, P.R. & HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n° 1, p. 39-63, 2002.

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

HANDLEY, R.S.; THACKRAY, A.C. Conservative radical mastectomy (Patey's operation). **Ann Surg**, v. 157, p. 162-4, 1963.

HALSTED, W.S. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. **Ann Surg**, v. 20, n° 5, p. 497-555, 1894.

HANAHAH, D. & WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

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. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, n° 2, p. 111-118, 2009.

HAO, X.; SUN, B.; HU, L.; LÄHDESMÄKI, H.; DUNMIRE, V.; FENG, Y.; ZHANG, S.W.; WANG, H.; WU, C.; WANG, H.; FULLER, G.N.; SYMMANS, W.F.; SHMULEVICH, I.; ZHANG, W. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. **Cancer**, v. 100, n° 6, p. 1110-1122, 2004.

HEASMAN, S. J. & RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n° 9, p. 690-701, 2008.

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.

HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; HEUSDEN, G. P. H. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signaling and apoptosis. **Bioessays**, v. 23, n° 10, p. 936-946, 2001.

HEMSTREET, G.P.; RAO, J.; HURST, R.E., BONNER, R.B.; WALISZEWSKI, P.;GROSSMAN, H.B., LIEBERT, M.; BANE, B.L. G-actin as a risk factor and modulatable endpoint for cancer chemoprevention trials. **J Cell Biochem Suppl.**, v. 25, p. 197-204, 1996.

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n° 4, p. 660-663, 1999.

HOFFMANN, E.D. & STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications, WILEY, 2007.

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.

HUANG, H.L.; STASYK, T.; MORANDELL, S.; DIEPLINGER, H.; FALKENSAMMER, G.; GRIESMACHER, A.; MOGG, M.; SCHREIBER, M.; FEUERSTEIN, I.; HUCK, C.W.; STECHER, G.; BONN, G.K.; HUBER, L.A. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/ MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. **Electrophoresis**, v. 27, n° 8, p. 1641-50, 2006.

HUDDLESTON, H.G.; WONG, K.K.; WELCH, W.R.; BERKOWITZ, R.S.; MOK, S.C. Clinical applications of microarray technology: creatine kinase B is an up-regulated gene in epithelial ovarian cancer and shows promise as a serum marker. **Gynecologic Oncology**, v. 96, n° 1, p. 77-83, 2005.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2010.

INCA. Instituto Nacional do 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>>, 2010.

InterPro. Disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

ISOLA, J.J.; KALLIONIEMI, O.P.; CHU, L.W.; FUQUA, S.A.; HILSENBECK, S.G.; OSBORNE, C.K.; WALDMAN, F.M. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 147, p. 905-911, 1995.

IVASKA, J.; PALLARI, H.M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 313, p. 2050-2062, 2007.

JACOBS, L.K. & BALCH, C.M. Predicting the Risk of Axillary Nodal Metastases and Their Use in Selecting Breast Surgery Options. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p.1-3, 2009.

JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U.; PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n° 2, p. 113-127, 2010.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer Statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**. v. 60, n° 5, p. 1-24, 2010.

JIN, H.; ZANGAR, R.C. Protein modifications as potential biomarkers in breast cancer. **Biomarker Insights**, v. 4, p. 191-200, 2009.

JING, Y.; ZHANG, J.; WAXMAN, S.; MIRA-Y-LOPEZ, R. Upregulation of cytokeratins 8 and 18 in human breast cancer T47D cells is retinoid-specific and retinoic acid receptor-dependent. **Differentiation**, v. 60, n° 2, p. 109-17, 1996.

JOHANN JR., D.J.; RODRIGUEZ-CANALES, J.; MUKHERJEE, S.; PRIETO, D.A.; HANSON, J.C.; EMMERT-BUCK, M.; BLONDER, J. Approaching Solid Tumor Heterogeneity on a Cellular Basis by Tissue Proteomics Using Laser Capture Microdissection and Biological Mass Spectrometry. **J Proteome Res.**, v. 8, n° 5, p. 2310-2318, 2009.

KAMADA, F.; AOKI, Y.; NARISAWA, A.; ABE, Y.; KOMATSUZAKI, S.; KIKUCHI, A.; KANNO, J.; NIIHORI, T.; ONO, M.; ISHII, N.; OWADA, Y.; FUJIMURA, M.; MASHIMO, Y.; SUZUKI, Y.; HATA, A.; TSUCHIYA, S.; TOMINAGA, T.; KARIHTALA, P.; MÄNTYNIEMI, A.; KANG, S.W.; *et al.* Peroxiredoxins in Breast Carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 3418-3424, 2003.

KANG, S.; KIM, M.J.; AN, H.J.; 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, p. 5638-5645, 2010.

KASTRITIS, P.L. & BONVIN, A.M.J.J. Are Scoring Functions in Protein-Protein Docking Ready To Predict Interactomes? Clues from a Novel Binding Affinity Benchmark. **J. Proteome Res**, v. 9, n° 5, p. 2216-2225, 2010.

KIM, D.H.; BAE, J.; LEE, J.W.; KIM, S.Y.; KIM, Y.H.; BAE, J.Y.; YI, J.K.; YU1, M.H.; NOH, D.Y.; LEE, C. Proteomic analysis of breast cancer tissue reveals upregulation of actin-remodeling proteins and its relevance to cancer invasiveness. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 3, p. 30-40, 2009.

KOENIG, U.; SOMMERGRUBER, W.; LIPPENS, S. Aberrant expression of caspase-14 in epithelial tumors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 335, n° 2, p. 309-13, 2005.

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.

KORDEK, R.; POTEMSKI, P.; KUSINSKA, R.; PLUCIENNIK, E.; BEDNAREK, A.; Basal keratin expression in breast cancer by quantification of mRNA and by immunohistochemistry. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.**, p. 29-39, 2010.

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.

KUMARATHASAN, P.; MOHOTTALAGE, S.; GOEGAN, P.; VINCENT, R. An optimized protein in-gel digest method for reliable proteome characterization by MALDI-TOF-MS analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 346, p. 85-89, 2005.

KURATA, S.; NIELSEN, K.H.; MITCHELL, S.F.; LORSCH, J.R.; KAJI, A.; KAJI, H. Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n° 24, p. 10854-10859, 2010.

LAHAT, G.; ZHU, Q.S.; HUANG, K.L.; WANG, S.; BOLSHAKOV, S.; LIU, J.; TORRES, K.; LANGLEY, R.R.; LAZAR, A.J.; HUNG, M.C.; LEV, D. Vimentin Is a Novel Anti-Cancer Therapeutic Target; Insights from In Vitro and In Vivo Mice Xenograft Studies. **PLoS ONE**, v. 5, n° 4, p. 1-19, 2010.

LAHDESMAKI, H.; HAO, X.; SUN, B.; HU, L.; YLI-HARJA, O.; SHMULEVICH, I.; ZHANG, W. Distinguishing key biological pathways between primary breast cancers and their lymph node metastases by gene function-based clustering analysis. **Int. J. Oncol**, v. 24, n° 6, p. 1589-1596, 2004.

LATTERICH, M.; ABRAMOVITZ, M.; LEYLAND-JONES, B. Proteomics: new technologies and clinical applications. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2737-2741, 2008.

LEE, S.O.; NADIMINTY, N.; WU, X.X.; ET AL. Selenium Disrupts Estrogen Signaling by Altering Estrogen Receptor Expression and Ligand Binding in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 65, p. 3487-3492, 2005.

LEE, W.L.; CHENG, M.H.; CHAO, H.T.; WANG, P.H. The Role of Selective Estrogen Receptor Modulators on Breast Cancer: From Tamoxifen to Raloxifene. **Taiwan Journal of Obstet Gynecol**, v. 47, n° 1, p. 24-31, 2008.

LI, J.; GROMOV, P.; GROMOVA, I.; MOREIRA, J.M.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; RANK, F.; KAIWANG; LI, S.; LI, H.; WIUF, C.; YANG, H.; ZHANG, X.; BOLUND, L.; CELIS, J.E. Omics-based profiling of carcinoma of the breast and matched regional lymph node metastasis. **Proteomics**, v. 8, p. 5038-5052, 2008.

LOEB, L.A. & HARRIS, C.C. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. **Cancer Res**, v. 68, n° 17, p. 6863- 6870, 2008.

MADDEN, J.L. Modified radical mastectomy. **Surg Gynecol Obstet**, v. 121, n° 6, p. 1221-30, 1965.

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, 2011.

McDONALD, C.B.; SELDEEN, K.L.; DEEGAN, B.J.; LEWIS, M.S.; FAROOQ, A. Grb2 adaptor undergoes conformational change upon dimerization. **Arch Biochem Biophys**, v. 475, n° 1, p. 25-35, 2008.

McNEILL, E.M.; ROOS, K.P.; MOECHARS, D.; CLAGETT-DAME, M.; Nav2 is necessary for cranial nerve development and blood pressure regulation. **Neural Development**, v. 5, n° 6, p. 1-14, 2010.

MASCOT. Disponível em <<http://www.matrixscience.com/>> Acessado em Janeiro de 2011.

MATSUBARA, Y.; KURE, S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. **J Hum Genet**, v. 56, n° 1, p. 34-40, 2011.

MEDZIHRADSKY, K.F.; CAMPBELL, J.M.; BALDWIN, M.A.; FALICK, A.M.; JUHASZ, P.; VESTAL, M.L.; BURLINGAME, A.L. The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. **Anal Chem**, v. 72, n° 3, p. 552-558, 2000.

MINAFRA, I.P.; 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.

MLYNARCZYK-LISZKA, J.; MAKSYMIUK, B.; PONIKIEWSKA, D.; KRZYZOWSKA-GRUCA, S.; LANGE, D.; KRAWCZYK, Z.; MALUSECKA, E. HSP27 diagnostic utility in the fine needle aspirate of breast. Correlation with progesterone and estrogen receptors **NEOPLASMA**, v. 56, n° 4, p. 357-360, 2009.

MORA, C.D.; MARTINS, W. P.; NASTRI, C.O. Ultra-sonografia da axila em mulheres com câncer de mama. **EURP**, v. 1, n° 2, p. 125-131, 2009.

MOSTAQUL HUQ, M.D.; GUPTA, P.; WEI, L.N. Post-translational modifications of nuclear co-repressor RIP140: a therapeutic target for metabolic diseases. **Curr. Med. Chem.**, v. 15, p. 386-92, 2008.

MOTOMURA, K.; NAGUMO, C.T.; KOMOIEKE, Y.; KOYAMA, H; INAJI, H. Accuracy of Imprint Cytology for Intraoperative Diagnosis os Sentinel Node Metastasis in Breast Cancer. **Annals of Surgery**, v. 247, n° 5, p. 839-842, 2008.

NAKAGAWA, T.; HUANG, S.K.; MARTINEZ, S.R.; TRAN, A.N.; ELASHOFF, D.; YE, X.; TURNER, R.R.; GIULIANO, A.E.; HOON, D.S.B. Proteomic Profiling of Breast Cancer Predicts Axillary Lymph Node Metastasis. **Cancer Res**, v. 66, n° 24, p. 11825-11830, 2006.

NISHIZAKI, T.; DEVRIES, S.; CHEW, K.; GOODSON, W.H.; LJUNG, B.M.; THOR, A.; WALDMAN, F.M. Genetic alterations in primary breast cancer and their metastases: Direct comparison using modified comparative genomic hybridization. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 19, p. 267-272, 1997.

NOBLE, J.E. & BAILEY, M.J.A. Quantitation of Protein. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 73-95, 2009.

NOBLE, J.E.; KNIGHT, A.E.; REASON, A.J.; DI MATOLA, A.; BAILEY, M.J. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. **Mol. Biotechnol.**, v. 37, p. 99-111, 2007.

NUSSBAUM, R.; ISAACS, C. Management updates for women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. **Mol Diagn Ther**, v. 11, p. 133-144, 2007.

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

O'CALLAGHAN-SUNOL, C.; GABAI, V.; SHERMAN, M.Y. Hsp27 Modulates p53 Signaling and Suppresses Cellular Senescence. **Cancer Res**, v. 67, n° 24, p. 11779-11788, 2007.

OHNISHI, T.; OHBA, H.; SEO, K.C.; IM, J.; SATO, Y.; IWAYAMA, Y.; FURUICHI, T.; CHUNG, S.K.; YOSHIKAWA, T. Spatial Expression Patterns and Biochemical Properties Distinguish a Second *myo*-Inositol Monophosphatase IMPA2 from IMPA1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n° 1, 2007.

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.

ONG, S. E.; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**, v. 8, n° 5, p. 195-205, 2001.

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.

PAIK, S.; SHAK, S.; TANG, G.; *et al.* Expression of the 21 genes in the Recurrence Score Assay and Tamoxifen clinical benefit in the NSABP study B-14 of node negative, estrogen receptor positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 2005 ASCO Annual Meeting Proceeding, v. 23, n° 16, 2005.

PAL, K.S. & PEGRAM, M. HER2 targeted therapy in breast cancer...beyond Herceptin. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 8, p. 269-277, 2007.

PALMIERI, D.; HALVERSON, D.O.; OUATAS, T.; *et al.* Medroxyprogesterone acetate elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor expression in hormone receptor-negative breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, p. 632-42, 2005.

PAYNE, S.J.L.; BOWEN, R.L.; JONES, J.L.; WELLS, C.A. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology**, v. 52, p. 82-90, 2008.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; RIJN, M.V.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, O.;

PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LONNING, P.E.; BORRESEN-DALE, A.L.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

Pfam. Disponível em <<http://pfam.sanger.ac.uk/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

PIATO, J.R.M.; PINCERATO, K.M.; GOMES, V.C.S.; CARVALHO, F.M.; PINHEIRO, W.S.; BARACAT, E.C. Metástase oculta em linfonodo sentinela no câncer de mama em estádios iniciais. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n° 9, p. 432-6, 2008.

PIR. Protein Information Resource. Disponível em <<http://pir.georgetown.edu/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

PITTERI, S.J. & HANASH, S.M. Proteomic approaches for cancer biomarker discovery in plasma. **Expert Rev Proteomics**, v. 4, n° 5, p. 589-590, 2007.

PIURA, E. & PIURA, B. Autoantibodies to Tumor-Associated Antigens in Breast Carcinoma. **Journal of Oncology**, p. 1-14, 2010

POLYAK, K & KALLURI, R. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland development and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, p. 1-14, 2010.

PREISLER, J.; FORET, F.; KARGER, B.L. On-Line MALDI-TOF MS Using a Continuous Vacuum Deposition Interface. **Anal Chem**, v. 70, n° 24, p. 5278-5287, 1998.

ProDom. Disponível em <<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>> Acessado em Fevereiro de 2011.

PROSITE. Disponível em <<http://expasy.org/prosite/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

ProtoMap. Disponível em <<http://protomap.stanford.edu/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

QUADROS, L.G.A.; GEBRIM, L.H. A pesquisa do linfonodo sentinela para câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n° 3, p. 158-64, 2007.

RAKHA, E.A.; EL-SAYED, M.E.; REIS-FILHO, J.S.; ELLIS, I.O. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. **Histopathology**, v. 52, p. 67-81, 2008.

RAMOT, Y.; PAUS, R.; TIEDE, S.; ZLOTOGORSKI, A. Endocrine controls of keratin expression. **BioEssays**, v. 31, p. 389-399, 2009.

RATTIGAN, Y.; HSU, J.M.; MISHRA, P.J.; GLOD, J.; BANERJEE, D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. **Exp Cell Res**. v. 316, n° 20, p. 3417-24, 2010.

READ, A. & DONNAI, D. *Genética Clínica: Uma nova Abordagem*. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 321, 2008.

REHFELD, J.F. & GOETZE, J.P. The posttranslational phase of gene expression: new possibilities in molecular diagnosis. **Curr. Mol. Med.**, v. 3, p. 25-38, 2003.

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, p. 1476-1482, 2008.

RENZ, M. & LANGOWSKI, J. Dynamics of the CapG actin-binding protein in the cell nucleus studied by FRAP and FCS. **Chromosome Research**, v. 16, p. 427-437, 2008.

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.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico Embrapa**, p. 1-11, 2005.

ROSEN, L.S.; ASHURST, H.L.; CHAP, L. Targeting Signal Transduction Pathways in Metastatic Breast Cancer: A Comprehensive Review. **The Oncologist**, v. 15, p. 216-235, 2010.

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.

SAHAI, E. Illuminating the metastatic process. **Nat Rev Cancer**, v. 7, p. 737-749, 2007.

SAMPATH, D. et al. CYR61, a member of the ccn family, is required for mcf-7 cell proliferation: regulation by 17 β -estradiol and overexpression in human breast cancer. **Endocrinology**, v. 142, n° 6, p. 2540-2548, 2001.

SANTOS, S.C.L.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.; URBAN, C.A.; LIMA, R.S.; BLEGGI-TORRES, L.F.; RONE, J.D.; HADDAD, B.R.; CAVALLI, L.R. Patterns of DNA copy number changes in sentinel lymph node breast cancer metastases. **Cytogenet Genome Res**, v. 122, p. 16-21, 2008.

SCHARTNER, J.M.; FATHMAN, C.G.; SEROOGY, C.M. Preservation of self: an overview of E3 ubiquitin ligases and T cell tolerance. **Semin. Immunol.**, v. 19, p. 188-96, 2007.

SCHMIDT, K.L.; MARCUS-GUERET, N.; ADELEVE, A.; WEBBER, J.; BAILLIE, D.; STRINGHAM, E.G. The cell migration molecule UNC-53/NAV2 is linked to the ARP2/3 complex by ABI-1. **Development**, v. 136, n° 4, p. 563-74, 2009.

SCHWEIZER, J.; BOWDEN, P.E.; COULOMBE, P.A.; LANGBEIN, L.; LANE, E.B.; MAGIN, T.M.; MALTAIS, L.; OMARY, B.; PARRY, D.A.D.; ROGERS, M.A.; WRIGHT, M.W. New consensus nomenclature for mammalian keratins. **The Journal of Cell Biology**, v. 174, n° 2, p. 169-174, 2006.

SEITZ, H.K. & STICKEL, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. **Genes Nutr**, v. 5, p. 121-128, 2010.

SCOP. Structural Classification of Proteins. Disponível em <<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>> Acessado em Fevereiro de 2011.

SHAH, Y.M.; AL-DHAHERI, M.; DONG, Y.; CLEMENT; JONES, F.E.; ROWAN, B.G. Selenium disrupts estrogen receptor A signaling and potentiates tamoxifen antagonism in endometrial cancer cells and tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n° 8, p. 1239-1249, 2005.

SHANTAKUMAR, S.; TERRY, M.B.; PAYKIN, A.; TEITELBAUM, S.L.; BRITTON, J.A.; MOORMAN, P.G.; KRITCHEVSKY, S.B.; NEUGUT, A.I.; GAMMON, M.D. Age and Menopausal Effects of Hormonal Birth Control and Hormone Replacement Therapy in Relation to Breast Cancer Risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n° 10, p. 1187-1198, 2007.

SHINOZAKI, M.; HOON, D.S.B.; GIULIANO, A. E. ; HANSEN, N.M.; WANG, H.J.; TURNER, R. TABACK, B. *et al.* Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 2156-2162, 2005.

SILVA, L.L.M.; TOSCANI, N.V.; GRAUDENZ, M.S. Male breast cancer: a different disease? **Mastologia**, v. 18, n° 4, p. 165-170, 2008.

SIJTS, E.J.; KLOETZEL, P.M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. **Cell Mol Life Sci**. Publish on line: 09 March, 2011.

SOENGAS, M.S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D.; MORA, J.; ESTELLER, M.; OPITZ-ARAYA, X.; McCOMBIE, R.; HERMAN, J.G.; GERALD, W.L.; LAZEBNIK, Y.A.; CORDON-CARDO, C.; LOWE, S.W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**, v. 409, n° 6817, p. 207-211, 2001.

SOERJOMATARAM, I.; LOUWMAN, M.W.; RIBOT, J.G.; ROUKEMA, J.A.; COEBERGH, J.W. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 107, n° 3, p. 309-330, 2008.

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

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.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C.M.; LONNING, P.E.; BROWN, P.O.; BORRESEN-DALE, A.L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 8418-8423, 2003.

STEINBERG, H.T. Protein Gel Staining Methods: An Introduction and Overview. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 541-563, 2009.

STINGL, J. & CALDAS, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n° 10, p. 791-799, 2007.

SUDHOF, TC. & ROTHMAN, J.E. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. **Science**, v. 323, n° 5913, p. 474-477, 2009

Surveillance Epidemiology and End Results (SEER). Disponível em <<http://seer.cancer.gov/statistics/>> Acessado em Dezembro de 2010.

SUZUKI, M. & TARIN, D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: Clinical implications. **Molecular Oncology**, v. 1, p. 172-180, 2007.

TAKEI, H.; SUEMASU, K.; KUROSUMI, M.; HORII, Y.; YOSHIDA, T.; NINOMIYA, J.; YOSHIDA, M.; HAGIWARA, Y.; KAMIMURA, M.; HAYASHI, Y. *et al.* Recurrence after sentinel lymph node biopsy with or without axillary lymph node dissection in patients with breast cancer. **Breast Cancer**, v. 14, n° 1, p. 16-24, 2007.

TAN, L.K.; GIRI, D.; HUMMER, A.J.; PANAGEAS, K.S.; BROGI, E.; NORTON, L.; HUDIS, C.; BORGES, P.I.; CODY, H.S. Occult Axillary Node Metastases in Breast Cancer Are Prognostically Significant: Results in 368 Node-Negative Patients With 20-Year Follow-Up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n° 11, p. 1803-1809, 2008.

TAN, S.M.; EVANS, A.J.; LAM, T.P.; CHEUNG, K.L. How relevant is breast cancer screening in the Asia/Pacific region? **The Breast**, v. 16, p. 113-119, 2007.

TEE, Y.T.; CHEN, G.D.; LIN, L.Y.; KO, J.L.; WANG, P.H. NM23-H1: A Metastasis-Associated Gene. **Taiwanese J Obstet Gynecol**, v. 45, n° 2, p. 106-113, 2006.

TIEZZI, D.G.; VALEJO, F.A.M.; NAI, G.A.; TIEZZI, M.G. Linfonodo-sentinela no câncer de mama acessória: relato de caso. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n° 1, p. 50-3, 2006.

TRASK, D.K.; BAND, V.; ZAJCHOWSKI, D.A.; YASWEN, P.; SUH, T.; SAGER, R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 2319-2323, 1990.

UNIPROT. Universal Protein Resource. Disponível em <<http://www.uniprot.org/>>

VAN ZEE, K.J.; MANASSEH, D.M.E.; BEVILACQUA, J.L.B.; BOOLBOL, S.K.; FEY, J.V.; TAN, L.K.; BORGEM, P.I.; CODY, H.S.; KATTAN, M.W. A Nomogram for Predicting the Likelihood of Additional Nodal Metastases in Breast Cancer Patients With a Positive Sentinel Node Biopsy. **Annals of Surgical Oncology**, v. 10, n° 10, p. 1140-1151, 2003.

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

VIEIRA, D.S.C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n° 1, p. 42-47, 2007.

VECCHI, M.; CONFALONIERI, S.; NUCIFORO, P.; VIGANO, M.A.; CAPRA, M.; BIANCHI, M.; NICOSIA, D.; BIANCHI, F.; GALIMBERTI, V.; VIALE, G.; PALERMO, G.; RICCARDI, A.; CAMPANINI, R.; DAIDONE, M.G.; PIEROTTI, M.A.; PECE, S.; DI FIORE, P.P. Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. **Oncogene**, v. 27, p. 2148-2158, 2008.

VINOTHINI, G.; MURUGAN, R.S.; NAGINI, S. Evaluation of molecular markers in a rat model of mammary carcinogenesis. **Oncol Res.**, v. 17, n° 10, p 483-493, 2009.

WALKER, L.C.; HARRIS, G.C.; HOLLOWAY, A.J.; MCKENZIE, G.W.; WELLS, J.E.; ROBINSON, B.A.; MORRIS, C.M. Cytokeratin KRT8/18 expression differentiates distinct subtypes of grade 3 invasive ductal carcinoma of the breast. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 178, p. 94-103, 2007.

WEIGELT, B.; GLAS, A.M.; WESSELS, L.F.; WITTEVEEN, A.T.; PETERSE, J.L.; VAN'T VEER, L.J.; Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n° 26, p. 15901-15905, 2003.

WEINBERG, R.A. A Biologia do Câncer. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 13, p. 19-50, 1996.

WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; VAN EYK, J.E. CHUNG, M.C.M.; GÖRG, A.; HECKER, M.; HUBER, L.A.; LANGEN, H.; LINK, A.J.; PAIK, Y.K.; PATTERSON, S.D.; PENNINGTON, S.R.; RABILLOUD, D.; SIMPSON, R.J.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Guidelines for the next 10 years of proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 4-8, 2006.

World Health Organization (WHO). WHO Cancer Control Programme. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em Agosto de 2010.

World Health Statistics 2008 (WHS). WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Disponível em <<http://www.who.int/whosis>> Acessado em Agosto de 2009.

YADAV, S.P. The Wholeness in Suffix *-omics*, *-omes*, and the Word *Om*. **J Biomol Tech**, v. 18, n° 5, p. 277, 2007.

ZARETSKY, J.Z. & WRESCHNER, D.H. Protein multifunctionality: Principles and mechanisms. **Translational Oncogenomics**, v. 3, p. 99-136, 2008.

ZHANG, S.M.; LEE, I.M.; MANSON, J.E.; COOK, N.R.; WILLETT, W.C.; BURING, J.E. Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk in the Women's Health Study. **American Journal of Epidemiology Advance Access**, 2007.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; DAGHER, M. C.; SHACTER, E. Rho GDP Dissociation Inhibitor Protects Cancer Cells against Drug-Induced Apoptosis. **Cancer Research**, v. 65, n° 14, p. 6054-6072, 2005.

ZHANG, T.; WANG, H.; CHEN, B.; ZHANG, H.; WEI, X.; FU, Y.; LI, Z.; HU, G. Risk factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with positive sentinel lymph nodes. **Chin Med J**, v. 121, n° 20, p. 2107-2109, 2008.

ZHOU, C.; NITSCHKE, A.M.; XIONG, W.; ZHANG, Q.; TANG, Y.; BLOCH, M.; ELLIOTT, S.; ZHU, Y.; BAZZONE, L.; YU, D.; WELDON, C.B.; SCHIFF, R.; MCLACHLAN, J.A.; BECKMAN, B.S.; WIESE, T.E.; NEPHEW, K.P.; SHAN, B.; BUROW, M.E.; WANG, G. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype. **Breast Cancer Research**, v. 10, n° 6, p. 105, 2008.

ZHOU, M. & VEENSTRA, T.D. Mass Spectrometry: *m/z* 1983-2008. **BioTechniques**, v. 44, n° 5, p. 667-670, 2008.

ARTIGO

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E METÁSTASES AXILARES CORRESPONDENTES

Heloisa Helena Zaccaron Milioli¹; Rodrigo Kaviski¹; Nayara Cristina dos Santos Oliveira¹; Cícero Andrade Urban²; Rubens Silveira de Lima^{2,3}; Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹; Iglénir João Cavalli¹.

1. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brasil.
2. Serviço de Oncologia, Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba/PR, Brasil.
3. Departamento de Tocoginecologia do Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba/PR, Brasil.

RESUMO

A avaliação de linfonodos axilares (LA) é um importante indicador clínico para o prognóstico no câncer de mama. Os mecanismos moleculares subjacentes à linfangiogênese e a metástase linfonodal e o grau de divergência clonal que caracterizam tumores primários e metástases axilares, contudo, permanecem mal compreendidos. Com o objetivo de contribuir para a compreensão de mudanças no perfil proteico que podem direcionar a progressão metastática regional, foram analisadas comparativamente amostras pareadas de tumores primários de mama e LAs metastáticos utilizando as metodologias proteômicas de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massa (MALDI-ToF). Os perfis proteômicos de sete pacientes com carcinoma ductal invasivo revelaram padrões semelhantes de expressão quando comparadas em conjunto, embora alterações individuais tenham sido observadas nos níveis de proteínas em alguns pares de amostras. A evidência de similaridades no perfil proteômico geral entre tumores primários e LAs sugerem que as principais características biológicas e moleculares do tumor primário de mama são mantidas no linfonodo metastático correspondente. Por outro lado, as proteínas diferenciais observadas, em sua maioria, apresentam funções biológicas relevantes para a carcinogênese mamária, envolvidas na organização do citoesqueleto, divisão celular, diferenciação e apoptose. As variações observadas também podem indicar possíveis marcadores de diagnóstico, prognóstico e como alvo terapêutico, ou ainda contribuir para o entendimento das vias biológicas responsáveis pela progressão neoplásica e metástase. Outras metodologias com abordagens genômicas e proteômicas, naturalmente, devem ser utilizadas para a validação dos resultados.

Palavras-Chave: Proteoma; 2D-PAGE; Carcinoma mamário: Tumor primário e linfonodo axilar.

ABSTRACT

The evaluation of axillary lymph nodes (ALN) is an important clinical indicator for prognosis in breast cancer. The molecular mechanisms underlying lymphangiogenesis and lymph node metastasis and the degree of clonal divergence that characterizes primary tumors and metastatic axillary lymph nodes, however, remain poorly understood. In order to elucidate changes in protein profiles that may direct the regional metastatic progression, a comparative analyzed were evaluated with paired samples of primary breast tumors and metastatic ALNs using proteomic methodologies as bidimensional electrophoresis (2D-PAGE) and mass spectrometry (MALDI-ToF). The proteome profiles of seven patients with invasive ductal carcinoma revealed similar patterns of expression when compared together, although individual changes were observed in protein levels in some pairs of samples. The evidence of similarities in the overall proteomic profile between primary tumors and ALN suggest that the main biological and molecular characteristics of primary breast tumor is kept in the corresponding metastatic lymph node. Moreover, the differential proteins observed have relevant biological functions to breast carcinogenesis, involved in cytoskeletal organization, proliferation, differentiation and apoptosis. The observed variations may also indicate possible markers for diagnosis, prognosis and as therapeutic targets, or contribute to the understanding of the biological pathways responsible for neoplastic progression and metastasis. Other methodologies, genomics and proteomics approaches, naturally, may be used to validate the results.

Keywords: Proteome; 2D-PAGE; Breast cancer: primary tumor and axillary lymph node.

I. INTRODUÇÃO

Uma das prioridades na pesquisa moderna do câncer de mama é compreender os mecanismos moleculares envolvidos na origem e evolução tumoral, que resultam em metástases. A pesquisa em linfonodos é de grande importância para o reconhecimento e compreensão dos mecanismos iniciais relacionados ao processo metastático (VECCHI, *et al.*, 2008).

Vários grupos analisaram os perfis de expressão gênica de carcinomas primários da mama e suas metástases linfonodais utilizando microarranjos de DNA.

De modo geral, poucas diferenças significativas foram observadas entre os dois grupos amostrais quando o número total de alterações cromossômicas foi comparado; o mesmo acontecendo quanto à complexidade cariotípica. Resultados semelhantes foram observados por *Santos et al.* (2008), utilizando CGH. A ausência de diferenças significativas contudo não define grande semelhança entre as amostras (SUZUKI & TARIN, 2007; LI *et al.*, 2008).

Maiores detalhes foram revelados em análises de expressão gênica comparando tumores primários e linfonodos axilares. *Suzuki & Tarin* (2007) encontraram 27 genes diferencialmente expressos, com significância estatística, nos pacientes avaliados. Em sua maioria, são genes que codificam para metaloproteinases, colágenos e osteonectina/espartina, também indicados em outros estudos como associados ao evento metastático. Genes de metaloproteinases e colágenos, são superexpressos no tumor primário, o que implica na maior atuação destes em fases iniciais da carcinogênese.

De modo geral, os genes superexpressos em tumores primários estão envolvidos na degradação da matriz extracelular, potencial metastático e capacidade de disseminação. Os genes com expressão aumentada atuam na transcrição, transdução de sinal e resposta imune, proporcionando vantagens proliferativas e de sobrevivência celular. Os genes *NTS* e *PAX5* foram encontrados superexpressos em linfonodos metastáticos, enquanto *COL11A1*, *KRT14*, *MMP13*, *TAC1* e *WNT2* apresentaram aumento de expressão em tumores primários de mama. Diferenças de expressão observadas em 51 genes no total sugerem o envolvimento de um conjunto gênico atuando para o sucesso da invasão e colonização de células tumorais em linfonodos (ELLSWORTH *et al.*, 2009).

Vecchi et al. (2008) sugerem que componentes do estroma atuam em conjunto com as células do tumor no processo de metástase. A perda de expressão de *SFRP2*, *POSTN* e *FN1* em metástases podem ocorrer devido a mudanças em componentes epiteliais, que diferem no ambiente peritumoral inicial e metastático. Alguns genes, como *SERPINB5*, *MMP7*, *APOD* e *LTF*, apresentam associação com tumores, quando pouco expressos, e estão relacionados com prognóstico desfavorável e habilidade metastática no câncer de mama. Divergências na expressão de *CXCR4* e *MMP9* também podem estar envolvidas no processo de invasão.

Nakagawa et al. (2006) observaram ainda a expressão diferenciada de timosina β -10, uma proteína de união a actina, altamente conservada, envolvida no crescimento e diferenciação dos vários tipos de células, com função sugestiva na invasão e metástase. Timosina β 10 é altamente expressa em tecidos fetais e pouco em tecidos adultos normais. A superexpressão desta proteína também é encontrada em muitos tumores, incluindo câncer de mama. A superexpressão de ubiquitina, por outro lado, estaria associada ao bom prognóstico no câncer de mama, observada em pacientes linfonodo negativos.

As semelhanças observadas entre os tumores primários e secundários fornecem evidências convincentes de que os processos biológicos fundamentais que determinam o aparecimento do fenótipo metastático apresentam homologias subjacentes. A identidade exata de genes e proteínas expressos que caracterizam a invasão ainda não é totalmente clara, embora o uso de metodologias diferenciadas possibilite a compreensão da atuação do conjunto genômico e proteômico. É importante reconhecer, todavia, que os tumores não são isolados de células malignas, mas conjuntos complexos de diferentes tecidos, que incluem componentes expressos das populações de células normais do hospedeiro atuando em resposta ao tumor (SUZUKI & TARIN, 2007).

A análise de amostras pareadas de tumores primários de mama e linfonodos axilares da mesma paciente têm possibilitado a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de metástase, fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativa de um comportamento clínico particular de cada neoplasia (SUZUKI & TARIN, 2007; VECCHI, *et al.*, 2008).

Através de metodologias proteômicas, com géis bidimensionais, foram avaliadas proteínas em tumores primários de mama e linfonodos axilares metastáticos. Os resultados mostraram uma alta similaridade entre os perfis de expressão proteômica global dos tumores primários e linfonodos axilares correspondentes. Apesar das semelhanças observadas, foram detectadas algumas alterações significativas no nível quantitativo das proteínas individuais em várias amostras pareadas de uma mesma paciente. Uma possível explicação para esta observação, no entanto, envolve as modificações nas células do tumor primário como resultado da transição epitelial-mesenquimal (LI *et al.*, 2008). Outros

trabalhos, contudo, são necessários para indentificar moléculas como potenciais marcadores de origem e progressão tumoral.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização das amostras

Amostras de tumores primários de mama e linfonodos axilares correspondentes foram obtidas de pacientes com 'Carcinomas Ductais Invasivos', em diferentes estágios clínicos. O grupo experimental (QUADRO 01), composto por sete mulheres, apresentou média de idade de $60,25 \pm 8,63$ anos. Os fragmentos foram coletados durante procedimentos cirúrgicos realizados nos hospitais Nossa Senhora das Graças e de Clínicas de Curitiba/ PR, nos períodos de 2008 e 2009. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR para o processamento.

AMOSTRA	IDADE	TIPO/ HISTOLÓGICO	GRAU	TAMANHO (mm)	LP/TL	RE	RP
CP 622	71 anos	Carcinoma Ductal Invasor	I	30	P (18/19)	P	P
CP 627	61 anos	Carcinoma Ductal Invasor	III	20	P (06/15)	P	P
CP 630	49 anos	Carcinoma Ductal Invasor	I	15	P (06/30)	P	P
CP 633	71 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	40	P (26/29)	P	P
CP 641	58 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	100	P (01/10)	N	N
CP 644	61 anos	Carcinoma Ductal Invasor	III	35	P (07/07)	N	N
CP 645	63 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	58	P (03/29)	P	P

QUADRO 01 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

NOTA: **LP** - Número de linfonodos positivos; **TL** - número total de linfonodos analisados; **RE** - Receptor de Estrogênio; **RP** - Receptor de Progesterona; **P** - Positivo; **N** - Negativo.

FONTE: o autor (2011)

Extração e quantificação protéicas

A lise das células foi realizada em tubos contendo 0,3g de amostra solubilizada em 1000 µl de Tampão de Lise (7M uréia, 2M tiouréia, 40mM tris e 4% CHAPS) e 2 µl de inibidor de protease (PMSF), conforme recomendado e adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). O tecido foi desagregado e homogeneizado com o auxílio de um triturador elétrico. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm (5 minutos, 4°C) e a solução contendo as proteínas foi estocada a -80°C. A concentração protéica foi mensurada a partir da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976).

Eletroforese Bidimensional

A fase unidimensional consiste na reidratação de *strips*, pH 4-7, em tampão de reidratação (7M uréia, 2M tiouréia, 50mM DTT, 0,5% IPG *buffer*, 2% CHAPS e *Azul de Bromofenol*) e amostra, num volume total de 250 μ l e 1000 μ g de proteínas. A Focalização Isoelétrica foi realizada no sistema de eletroforese *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare), durante 5 horas. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE), com dimensões de 18 x 16 cm, no sistema eletroforético *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare). A coloração utilizada para os géis foi o *Coomassie* coloidal adaptada de WESTERMEIER, 2006.

Digitalização e análise das imagens

As imagens foram digitalizadas utilizando o equipamento *ImageScannertm II* (GE Healthcare) e a análise das imagens realizada no software *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os parâmetros para a detecção das bandas pelo programa foram os seguintes: *min area* – 5; *smooth* – 3; e *saliency* – 25. Géis representativos de tumores primários e linfonodos axilares foram comparados qualitativamente e quantitativamente, quanto a presença e ausência de proteínas e diferenças de expressão. O programa utiliza como parâmetro para a análise estatística o volume relativo das bandas. A normalização do volume dos pontos protéicos detectados considera o volume total dos pontos protéicos, no qual o volume de cada ponto é dividido pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100. Tais dados foram analisados estatisticamente através do teste *t* de Student, considerando como bandas diferencialmente expressas as que apresentassem uma variação estatística significativa ($p < 0,05$).

Identificação de proteínas diferenciais

Os *spots* relevantes foram removidos manualmente dos géis, descorados e desidratados. Para a digestão proteolítica, as bandas selecionadas foram reidratados em 10 μ l de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega*) (15 ng/ μ L em tampão contendo 40 mM de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila). Os peptídeos em solução foram misturados, na proporção 1:1, com solução matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e aplicados em placa de MALDI. As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um

espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo *Autoflex II* (Bruker Daltonics) e MALDI-Tof/MS micro MX (Waters Corporation). A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando os programas *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics) e *MassLynx 4.0* (Waters Corporation). As proteínas foram identificadas a partir do padrão de massas obtido (PMF – *peptide mass fingerprinting*) e fragmentação peptídica (MS/MS), utilizando o programa MASCOT (Matrix Science) associado ao banco de dados *SWISS-PROT*.

III. RESULTADOS

Na análise individual dos pares amostrais de tumores primários e linfonodos axilares, um valor médio de $19,71 \pm 9,52$ *spots* diferenciais foi observado entre as amostra. Foram selecionadas para identificação bandas com valor de *p* menor que 0,02, aumentando a confiabilidade do resultado de 95% (0,05) para mais de 98%. Nem todas as bandas, contudo, apresentaram identificação positiva por espectrometria de massa. Neste contexto, 127 proteínas foram detectadas através de espectrometria de massa.

As TABELAS 01 e 02 apresentam os *spots* exclusivos e diferenciais, respectivamente, identificados nos linfonodos axilares metastáticos. Sete *spots* foram observados somente nesses linfonodos, contudo, apenas seis proteínas foram exclusivas destas amostras. Entre 51 *spots* observados com expressão aumentada nos linfonodos e 39 proteínas diferentes identificadas, 28 apresentaram aumento de expressão somente nestas amostras.

As TABELAS 03 e 04 apresentam os *spots* exclusivos e diferenciais, respectivamente, identificados em amostras de tumores primários. Oito *spots* foram observados somente nestes tumores, no entanto, apenas duas proteínas foram exclusivas destas amostras. Entre 61 *spots* observados com expressão aumentada nos tumores primários e 29 proteínas diferentes identificadas, 20 apresentaram aumento de expressão somente nestas amostras.

TABELA 01 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS OBSERVADAS SOMENTE NOS LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS

Proteína	L – Spot ID	Teste t	p<	Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c e. MM/pl o.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
Inibidor de dissociação alfa de Rab / GDP (GDIA)	CP 645L – 2631	42,34	0,02	P31150	GDI1	Xq28	51.18/5.00 69.00/4.93	95	52
Microtúbulo-actina factor de ligação 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1)	CP 645L* - 3353	5,733	0,001	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	62.36/5.27 26.00/5.11	73	29
Navegador 2 de neurônio (NAV2)	CP 645L* - 3353	5,733	0,001	Q8IVL1	NAV2	11p15.1	26.93/9.13 26.00/5.11	58	28
Serina/treonina fosfatase do tipo 1, subunidade catalítica PP1-beta (PP1B)	CP 645L* - 3161	5,146	0,001	P62140	PPP1CB	2p23.2	37.96/5.85 37.00/5.10	64	50
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	CP 627L – 3534	33,17	0,02	P09493	TPM1	15q22.2	32.75/4.69 37.00/4.53	63	73
Ubiquitina tioesterase (OTU1)	CP 622L – 2062	47,53	0,02	Q96FW1	OTUB1	11q13.1	31.49/4.85 37.00/4.73	*33	*5
Vinculina (VINC)	CP 645L* - 3353	5,733	0,001	P18206	VCL	10q22.2	12.43/5.50 26.00/5.11	63	41

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a sequência identificada; ^d *Score* obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Sequência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a sequência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada. Em destaque, proteínas exclusivas nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

TABELA 02 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA NOS LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS

Proteína	L – Spot ID	VD	Teste t	p<	Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c e. MM/pl o.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01	P60709	ACTB	7p22.1	42.05/5.29 43.00/5.18	116	28
Actina citoplasmática 2 (ACTG)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01	P63261	ACTG1	17q25.3	42.11/5.31 43.00/5.18	116	28
Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01	P68032	ACTC1	15q14	42.33/5.23 43.00/5.18	77	19
Actina alfa, músculo esque-lético (ACTS)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01	P68133	ACTA1	1q42.13	42.36/5.23 43.00/5.18	76	19
Actina gama, músculo liso (ACTH)	CP 622L - 1937	2,171	8,513	0,01	P63267	ACTG2	2p13.1	42.25/5.31 43.00/5.18	61	16

Aldeído desidrogenase, mitocondrial (ALDH2)	CP 641L -2085	2,609	7,439	0,01	P05091	ALDH2	12q24.12	56.86/6.63 60.00/6.04	117	21
	CP 644L -2552	2,542	14,66	0,001	P05091	ALDH2	12q24.12	56.86/6.63 54.00/6.12	58	53
Amino peptidase citosólica (AMPL)	CP 641L -2074	2,299	8,119	0,01	P28838	LAP3	4p15.32	56.53/8.03 61.00/6.89	126	33
Antígeno KI-67 (KI67)	CP 645L -3000	2,199	7,900	0,01	P46013	MKI67	10q26.2	36.07/9.49 43.00/6.11	62	29
Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB)	CP 644L -2774	4,518	14,21	0,001	P02675	FGB	4q31.3	56.58/8.54 42.00/5.73	124	59
	CP 644L -2781	2,082	5,328	0,01	P02675	FGB	4q31.3	56.58/8.54 42.00/5.99	80	49
Cadeia 2 Ig lambda, região C (LAC2)	CP 644L -3004	2,352	11,38	0,001	P0CG05	IGLC2	22q11.2	11.46/6.92 30.00/6.39	61	46
Fator de alongação Ts mitocondrial (EFTS)	CP 645L -3196	2,623	20,48	0,001	P43897	TSMF	12q14.1	35.71/8.62 35.00/6.86	56	43
Gama-enolase (ENOG)	CP 645L -2829	2,066	12,64	0,001	P09104	ENO2	12p13.31	47.58/4.91 53.00/4.82	141	32
Glutathiona S-transferase P (GSTP1)	CP 627L -3812	2,933	21,67	0,001	P09211	GSTP1	11q13.2	23.57/5.43 25.00/5.67	127	57
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	CP 641L -2483	2,016	4,961	0,01	P52565	ARHGDI A	17q25.3	23.25/5.02 31.00/4.83	75	25
Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2)	CP 641L -2491	3,837	5,812	0,01	P52566	ARHGDI B	12p12.3	23.03/5.10 30.00/4.97	82	57
	CP 645L -3284	2,592	35,99	0,001	P52566	ARHGDI B	12p12.3	23.03/5.10 30.00/5.09	67	23
Inositol monofosfatase 1 (IMPA1)	CP 645L -3244	2,738	7,882	0,01	P29218	IMPA1	8q21.13	30.56/5.16 32.00/5.05	79	49
Interleucina 6 (IL6)	CP 630L -2967	2,471	11,39	0,001	P05231	IL6	7p15.3	23.93/6.17 26.00/5.21	57	54
Metionil-tRNA formil-transferase, mitocondrial (FMT)	CP 627L -3673	2,234	5,689	0,02	Q96DP5	MTFMT	15.q22.31	44.20/9.70 31.00/4.64	59	50
Microtúbulo-actina fator de ligação cruzada 1, isoformas 1/2/3/5 (MACF1)	CP 645L -3243	2,855	6,852	0,01	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	62.36/5.27 32.00/4.64	74	24
	CP 645L -2945	3,742	14,28	0,001	Q9UPN3	MACF1	1p34.3	62.36/5.27 45.00/4.40	64	12
Peroxiredoxina 1 (PRDX1)	CP 645L -3369	8,550	9,250	0,01	Q06830	PRDX1	1p34.1	22.32/8.27 25.00/6.71	64	36

Peroxiredosina 4 (PRDX4)	CP 644L -3022	2,198	5,604	0,01	Q13162	PRDX4	Xp22.11	30.75/5.86 29.00/5.79	149	40
Peroxiredoxina 6 (PRDX6)	CP 622L - 2164	2,364	9,404	0,001	P30041	PRDX6	1q25.1	25.23/6.00 29.00/6.22	56	72
Poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG)	CP 641L -2092	2,457	4,686	0,01	Q86W56	PARG	10q11.23	11.25/6.03 59.00/4.49	62	46
Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento (GRB2)	CP 645L -3325	2,481	14,65	0,001	P62993	GRB2	17q25.1	25.30/5.89 28.00/6.14	56	46
Proteína 3 relacionada a actina (ARP3)	CP 641L -2129	2,641	7,039	0,01	P61158	ACTR3	2q14.1	47.78/5.61 56.00/5.71	179	39
Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6)	CP 641L -2176	11,226	11,26	0,01	Q96JE9	MAP6	11q13.5	86.68/9.20 51.00/6.31	81	50
	CP 645L -3303	2,233	18,99	0,001	Q96JE9	MAP6	11q13.5	86.68/9.20 30.00/5.81	70	41
Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA)	CP 622L - 2064	2,227	5,737	0,01	P54920	NAPA	19q13.32	33.67/5.23 36.00/5.26	163	44
Proteína de nivelamento F-actina subunidade beta (CAPZB)	CP 641L -2433	2,248	9,699	0,001	P47756	CAPZB	1p36.13	31.62/5.36 35.00/5.66	112	31
Proteína de processamento do RNA ribossomal 1, homolog. A (RRP1)	CP 644L -2529	2,239	5,229	0,02	P56182	RRP1	21q22.3	53.04/9.39 56.00/6.71	56	39
Proteína 'heat shock' beta-1 (HSPB1)	CP 645L -3290	2,033	46,93	0,001	P04792	HSPB1	7q11.23	22.83/5.98 30.00/5.41	84	40
	CP 645L -3291	5,269	30,33	0,001	P04792	HSPB1	7q11.23	22.83/5.98 30.00/5.88	71	37
	CP 645L -3334	5,678	14,31	0,001	P04792	HSPB1	7q11.23	22.83/5.98 27.00/6.67	114	37
Proteína ligante de macrófago (CAPG)	CP 641L -2272	2,022	6,390	0,01	P40121	CAPG	2p11.2	38.76/5.82 43.00/6.08	*62	*3
Proteína ligante de selênio 1 (SBP1)	CP 645L -2751	2,217	38,22	0,001	Q13228	SELENBP1	1q21.3	52.93/5.93 59.00/6.31	76	15
Proteína RING finger 213(RN213)	CP 645L -2980	3,147	15,32	0,001	Q63HN8	RNF213	17q25.3	37.85/6.47 44.00/4.54	56	20
	CP 645L -2945	3,742	14,28	0,001	Q63HN8	RNF213	17q25.3	37.85/6.47 45.00/4.40	58	13
Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7)	CP 645L -2768	3,019	15,11	0,001	P08729	KRT7	12q13.13	51.41/5.40 58.00/5.19	189	52

Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8)	CP 630L - 2467	3,027	12,63	0,001	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 56.00/5.29	59	66
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19)	CP 622L - 2160	2,074	4,147	0,02	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 29.00/5.43	159	37
	CP 627L - 3366	3,021	9,469	0,001	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 42.00/4.81	289	60
	CP 630L -2677	3,824	16,81	0,001	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 43.00/4.84	163	61
	CP 630L -2690	2,393	12,12	0,001	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 43.00/4.77	121	54
Serpina B9 (SPB9)	CP 641L -2249	7,510	28,08	0,001	P50453	SERPINB9	6p25.2	43.00/5.61 45.00/5.69	201	43
Vimentina (VIME)	CP 630L -2519	2,275	6,712	0,01	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 53.00/4.75	59	15
	CP 630L -2524	4,284	21,74	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 52.00/4.64	56	48
Vitronectina (VTNC)	CP 645L -2968	3,904	16,37	0,001	P04004	VTN	17q11.2	55.07/5.55 44.00/4.46	84	14

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada. Em destaque, proteínas com perfil particular de expressão aumentada nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

TABELA 03 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS OBSERVADAS SOMENTE EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

Proteína	T – Spot ID	Teste t	p<	Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pl ^c . MM/plo.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
Aspartil tRNA sintetase citoplasmática (SYDC)	CP 645T – 3301	31,89	0,02	P14868	DARS	2q21.3	57.49/6.11 42.00/5.86	57	68
Proteína de fusão solúvel NSF alfa (SNAA)	CP 645T – 3451	72,33	0,01	P54920	NAPA	19q13.32	33.67/5.23 35.00/5.28	104	77
Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6)	CP 645T – 3604	192,9	0,01	Q96JE9	MAP6	11q13.5	86.68/9.20 28.00/5.11	104	49
Proteína CYR61 (CYR61)	CP 645T – 3551	59,60	0,02	O00622	CYR61	1p22.3	44.16/8.64 30.00/5.19	56	28

Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7)	CP 645T - 3200	43,69	0,02	P08729	KRT7	12q13.13	51.41/5.40 46.00/5.23	62	62
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19)	CP 633T - 6080	37,69	0,02	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 42.00/4.74	89	20
Vimentina (VIME)	CP 645T* - 3551	20,31	0,001	O00622	CYR61	1p22.3	44.16/8.64 30.00/5.19	56	28
	CP 630T - 3725	42,17	0,02	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 46.00/4.86	165	62

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada. Em destaque, proteínas exclusivas nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

TABELA 04 – IDENTIFICAÇÃO DE SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

Proteína	T – Spot ID	VD	Teste t	p<	Acesso SwissProt ^a	Gene UniGene ^b	Locus Gênico	MM/pi ^c e. MM/plo.	Score ^d	Cobertura ^e (%)
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001	P60709	ACTB	7p22.1	42.05/5.29 42.00/5.11	138	30
Actina citoplasmática 2 (ACTG)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001	P63261	ACTG1	17q25.3	42.11/5.31 42.00/5.11	138	30
Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001	P68032	ACTC1	15q14	42.33/5.23 42.00/5.11	96	21
Actina alfa, músculo esquelético (ACTS)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001	P68133	ACTA1	1q42.13	42.36/5.23 42.00/5.11	95	21
Actina gama, músculo liso (ACTH)	CP 641T - 2197	2,514	8,777	0,001	P63267	ACTG2	2p13.1	42.25/5.31 42.00/5.11	78	18
Alfa-1 antitripsina (A1AT)	CP 622T - 3992	2,102	4,577	0,02	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 63.00/4.85	88	19
	CP 627T - 2470	2,834	11,45	0,001	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 53.00/4.96	155	32
	CP 645T - 3087	2,985	8,903	0,001	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 54.00/4.77	151	24
	CP 644T - 3395	2,598	6,070	0,01	P01009	SERPINA1	14q32.13	46.88/5.37 59.00/4.94	78	16

Anexina A4 (ANXA4)	CP 644T - 3850	3,569	7,168	0,02	P09525	ANXA4	2p13.3	36,10/5,84 33.00/5.86	110	26
Apolipoproteína A-I (APOA1)	CP 622T - 4247	3,552	11,43	0,001	P02647	APOA1	11q23.3	30.76/5.56 41.00/5.06	108	41
	CP 645T - 3633	12,28	28,56	0,001	P02647	APOA1	11q23.3	30.76/5.56 26.00/5.35	67	67
Caspase-14 (CASPE)	CP 645T - 3555	2,246	8,702	0,001	P31944	CASP14	19p13.12	27.90/5.44 31.00/5.62	76	31
Catepsina D (CATD)	CP 630T - 4061	2,593	4,675	0,02	P07339	CTSD	11p15.5	45.04/6.10 30.00/4.48	62	42
	CP 641T - 2451	2,852	8,406	0,01	P07339	CTSD	11p15.5	45.04/6.10 31.00/5.78	138	24
Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1)	CP 645T - 3538	2,406	10,15	0,001	Q06323	PSME1	14q12	28.90/5.78 31.00/5.96	143	52
Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2)	CP 633T - 6194	2,446	6,208	0,01	Q9UL46	PSME2	14q12	27.55/5.54 33.00/5.45	56	60
	CP 645T - 3522	3,515	7,554	0,02	Q9UL46	PSME2	14q12	27.50/5.44 32.00/5.56	69	21
	CP 644T - 3881	2,411	6,296	0,01	Q9UL46	PSME2	14q12	27.50/5.44 32.00/5.41	69	21
Creatina quinase tipo B (KCRB)	CP 644T - 3608	2,471	6,419	0,01	P12277	CKB	14q32.32	42.90/5.34 45.00/5.52	91	26
Fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF)	CP 641T - 2543	2,942	16,90	0,001	O14727	APAF1	12q23.1	14.41/5.96 28.00/6.16	*7	*1
Ferritina, cadeia leve (FRIL)	CP 630T - 4243	2,438	9,973	0,001	P02792	FTL	19q13.33	20.06/5.51 22.00/5.68	63	36
Nucleosídeo difosfato quinase A (NDKA)	CP 633T - 6343	2,255	8,423	0,01	P15531	NME1	17q21.33	17.31/5.83 22.00/5.94	110	51
Proteína 14-3-3 gama (1433G)	CP 644T - 3902	2,251	5,728	0,02	P61981	YWHAG	7q11.23	28.40/4.80 31.00/4.58	87	35
	CP 645T - 3554	2,459	9,608	0,001	P61981	YWHAG	7q11.23	28.40/4.80 31.00/4.82	87	35
Proteína 14-3-3 teta (1433T)	CP 644T - 3901	3,836	8,927	0,01	P27348	YWHAQ	2p25.1	28.03/4.68 31.00/4.46	80	27
	CP 645T - 3556	3,037	5,986	0,01	P27348	YWHAQ	2p25.1	28.00/4.68 31.00/4.71	129	33

Proteína zeta/delta (1433Z)	CP 644T - 3917	3,326	7,675	0,01	P63104	YWHAZ	8q22.3	27.90/4.73 30.00/4.51	187	52
Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)	CP 644T - 3814	4,807	8,688	0,02	P14136	GFAP	17q21.31	49.91/5.42 36.00/5.18	*58	*2
Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8)	CP 630T - 3652	3,887	9,093	0,001	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 50.00/5.76	73	67
	CP 645T - 3086	2,565	7,151	0,01	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 54.00/5.75	91	19
	CP 645T - 3131	2,161	5,836	0,01	P05787	KRT8	12q13.13	53.67/5.52 51.00/5.55	62	13
Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19)	CP 633T - 6060	4,161	10,31	0,01	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 44.00/4.91	252	51
	CP 633T - 6061	2,498	7,104	0,01	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 44.00/5.04	250	47
	CP 633T - 6064	2,279	6,164	0,01	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 44.00/4.85	195	41
	CP 633T - 6066	2,595	6,863	0,01	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 43.00/4.97	283	45
	CP 641T - 2223	2,449	4,671	0,01	P08727	KRT19	17q21.2	44.08/5.04 42.00/4.76	78	29
Serotransferrina (TRFE)	CP 622T - 3871	2,338	7,083	0,01	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 86.00/6.65	108	40
	CP 622T - 3873	2,676	16,41	0,001	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 85.00/6.74	99	25
	CP 627T - 2257	4,608	13,24	0,001	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 87.00/6.64	57	39
	CP 627T - 2258	2,846	8,332	0,01	P02787	TF	3q22.1	79.29/6.81 87.00/6.73	169	22
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	CP 641T - 2370	9,882	15,57	0,01	P09493	TPM1	15q22.2	32.75/4.69 35.00/4.52	112	34
Tropomiosina cadeia beta (TPM2)	CP 641T - 2312	13,105	13,87	0,001	P07951	TPM2	9p13.3	32.95/4.66 38.00/4.44	116	25
	CP 644T - 3847	5,555	11,67	0,01	P07951	TPM2	9p13.3	32.94/4.66 33.00/4.45	66	24
	CP 641T - 2370	9,882	15,57	0,01	P07951	TPM2	9p13.3	32.95/4.66 35.00/4.52	73	29
Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3)	CP 641T - 2370	9,882	15,57	0,01	P06753	TPM3	1q21.3	32.86/4.68 35.00/4.52	58	23

Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4)	CP 641T - 2312	13,105	13,87	0,001	P67936	TPM4	19p13.12	28.62/4.67 38.00/4.44	60	16
	CP 641T - 2434	5,573	12,56	0,01	P67936	TPM4	19p13.12	28.62/4.67 32.00/4.46	168	47
	CP 644T - 3847	5,555	11,67	0,01	P67936	TPM4	19p13.12	28.62/4.67 33.00/4.45	168	47
	CP 645T - 3503	2,900	8,389	0,01	P67936	TPM4	19p13.12	28.60/4.67 33.00/4.71	99	34
Vimentina (VIME)	CP 622T - 4126	2,607	8,813	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 50.00/4.74	264	47
	CP 622T - 4154	3,959	6,701	0,01	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 47.00/4.61	97	58
	CP 627T - 2470	2,834	11,45	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 53.00/4.96	113	27
	CP 627T - 2592	2,858	11,18	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 43.00/4.68	187	33
	CP 627T - 2601	3,889	30,69	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 43.00/4.59	310	49
	CP 630T - 3758	11,850	39,94	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 45.00/4.73	61	34
	CP 645T - 3167	8,139	11,37	0,001	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 48.00/4.79	169	32
	CP 645T - 3231	4,848	11,69	0,01	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 45.00/4.65	86	50
	CP 645T - 3282	2,203	7,141	0,01	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 43.00/4.67	70	68
	CP 645T - 3329	2,978	7,917	0,01	P08670	VIM	10p13	53.68/5.06 41.00/4.60	183	31
Zinco-alfa-2-glicoproteína (ZA2G)	CP 641T - 2240	5,301	5,125	0,02	P25311	AZGP1	7q22.1	34.46/5.71 41.00/5.00	115	25

NOTA: ^a Código de acesso da proteína no *SwissProt*; ^b Representante de acesso no *UniGene*; ^c Massa (kDa) e Ponto Isoelétrico esperados e observados para a seqüência identificada; ^d Score obtido em consulta ao MASCOT, utilizando MALDI-TOF/MS; ^e Seqüência de cobertura dos peptídeos encontrados em relação a seqüência completa da proteína, em porcentagem; - proteína não identificada. Em destaque, proteínas com perfil particular de expressão aumentada nas amostras de linfonodos axilares.

FONTE: o autor (2011).

As proteínas não destacadas nas TABELAS 01, 02, 03 e 04 se referem às comuns entre amostras de tumores primários de mama e linfonodos axilares observadas em diferentes *spots*, ou seja, com valores distintos de MM e pl, que correspondem a diferentes isoformas destas proteínas. São elas: Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG); Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina gama, músculo liso (ACTH); *Proteína de fusão solúvel NSF alfa* (SNAA); Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6); Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7); Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8); Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19); Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1); e Vimentina (VIME).

A FIGURA 01 apresenta os géis de referência CP 645L e CP645T, respectivamente, com todas as proteínas identificadas entre as amostras de linfonodos axilares e tumores primários de mama, exceto as queratinas do citoesqueleto. Em amostras de linfonodos axilares, nas comparações individuais entre pacientes, os *spots* correspondentes a proteína Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2) estavam mais expressos nas amostras CP 641L e CP 546L, quando comparados aos respectivos *spots* dos tumores primários de mama. As amostras de tumores primários, por outro lado, apresentaram quantidade maior de bandas comuns (nove) com valores de expressão aumentada, referente a seis proteínas diferentes: Serotransferrina (TRFE), Vimentina (VIME), Tropomiosina cadeia alfa 4 (TPM4), Proteína 14-3-3 gama (1433G), Proteína 14-3-3 teta (1433T), Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PMSE2). A proteína Vimentina, como destaque, apresentou maior número de isoformas com expressão aumentada em tumores primários de mama.

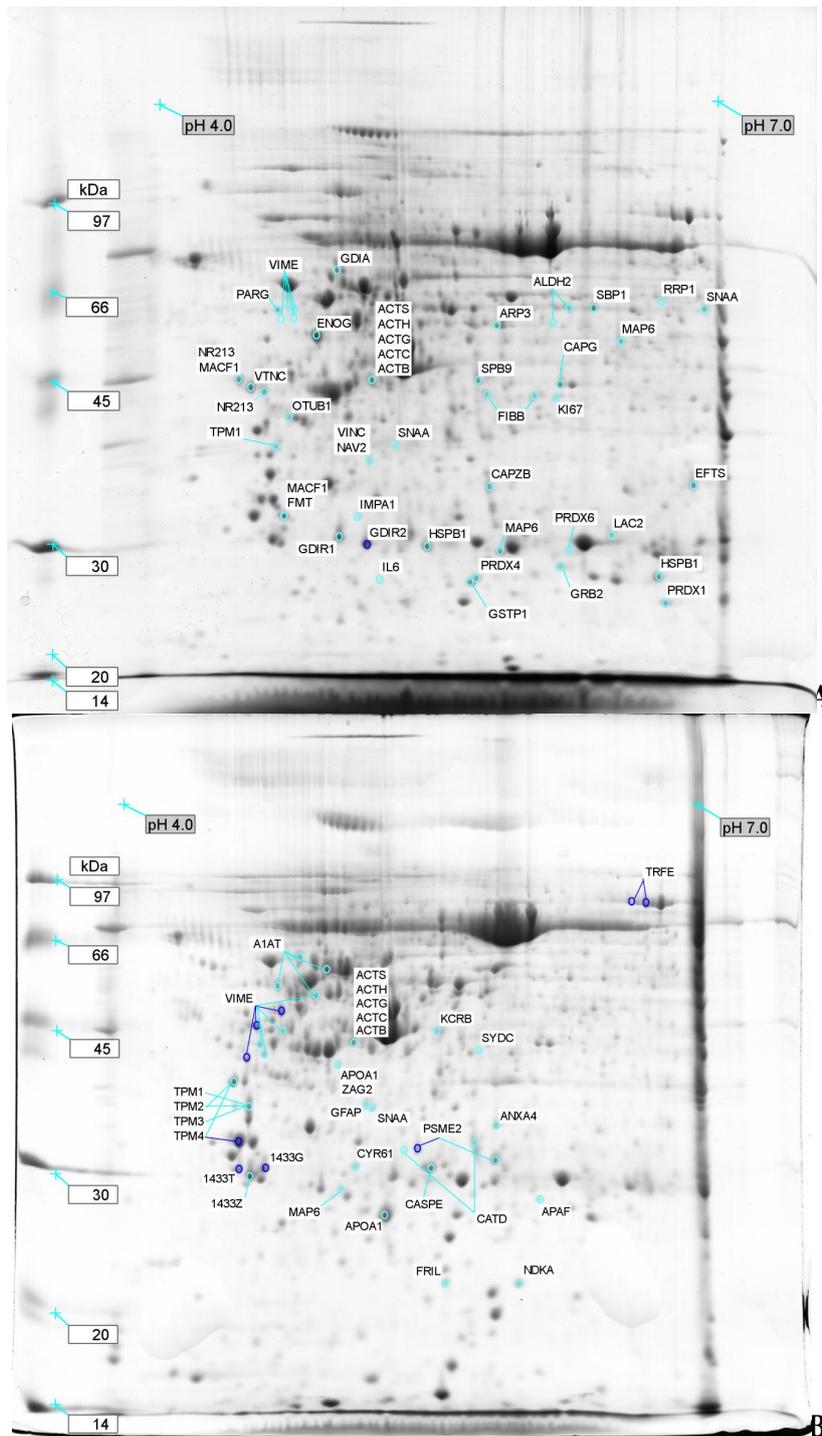


FIGURA 01 – **(A)** GÉL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA REFERÊNCIA CP 645L E O PERFIL PROTEÔMICO DIFERENCIAL ESPRESSO NO CONJUNTO DE LINFONODOS AXILARES. **(B)** GÉL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA REFERÊNCIA CP 645T E O PERFIL PROTEÔMICO DIFERENCIAL ESPRESSO NO CONJUNTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. A primeira dimensão realizada em tira de IPG pH 4-7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie* coloidal. As bandas diferenciais, exclusivas e/ou mais expressas, estão destacadas em azul claro e azul escuro. A última cor indica o mesmo *spot* diferencial presente em mais de uma amostra. As identidades protéicas estão marcadas nas etiquetas com o nome abreviado do *Swiss-Prot*. Estão incluídas na imagem as variantes MM e pl.
 FONTE: o autor (2011).

IV. DISCUSSÃO

O proteoma é altamente dinâmico em suas funções biológicas. Eventuais alterações no controle da expressão gênica, desde a transcrição do mRNA até modificações pós-tradicionais (MPT), estão diretamente associadas a ampla variedade de tamanho, forma e complexidade dos produtos (GRAVES & HAYSTEAD, 2002). Algumas dessas modificações ampliam o conjunto de possíveis funções protéicas pela adição de novos grupos funcionais ou de cadeias de carboidratos e/ou lipídeos, alterando valores esperados de MM e pl nas proteínas. Modificações, como a fosforilação, são parte de um sistema para controlar o comportamento protéico, ativando ou inativando proteínas, amplamente utilizado pela célula (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

Em alguns casos, a mesma proteína identificada em diferentes bandas, localizadas em regiões distintas no gel, sugere o envolvimento de MPTs específicas. As proteínas não destacadas nas TABELAS 01, 02, 03 e 04, como exemplo, se referem à proteínas comuns entre amostras de tumores primários de mama e linfonodos axilares, observadas em diferentes *spots*, ou seja, com valores distintos de MM e pl, que correspondem a diferentes isoformas destas proteínas. São elas: Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG); Actina alfa 1, músculo cardíaco (ACTC); Actina alfa, músculo esquelético (ACTS); Actina gama, músculo liso (ACTH); *Proteína de fusão solúvel NSF alfa* (SNAA); Proteína associada a microtúbulo 6 (MAP6); Queratina do citoesqueleto 7, tipo II (K2C7); Queratina do citoesqueleto 8, tipo II (K2C8); Queratina do citoesqueleto 19, tipo I (K1C19); Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1); e Vimentina (VIME). Neste caso, o envolvimento em diversas vias regulatórias de processos tumorais e modificações pós-traducionais com alteração de função não devem ser desconsiderados.

O perfil protéico de cada paciente se encontra em constante transformação, influenciado por diversos fatores, incluindo interações célula a célula, célula e microambiente e mudanças hormonais particulares, que alteram a proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e capacidade de invadir as células/tecidos adjacentes (POLYAK & KALLURI, 2010). Além da provável diversidade entre pacientes e tumores, detalhes subjetivos da análise comparativa, em ferramentas de bioinformática ainda incompletas, devem ser considerados e os resultados de proteínas exclusivas, melhor avaliados. O fato de estarem presentes e ausentes nos géis de referência de determinada paciente não significa que o mesmo evento

ocorra em outras amostras. Ao contrário, ou seja, a exclusão da proteína como diferencial também não caracteriza irrelevância da mesma em processos carcinogênicos.

Entre as proteínas identificadas, a maioria apresenta funções associadas a mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese do câncer de mama, como, regulação da divisão e diferenciação celular, organização do citoesqueleto, detoxificação, capacidade de adesão e apoptose, justificando a importância do método na pesquisa do câncer. As proteínas diferenciais consideradas relevantes, no entanto, para aprofundar a discussão foram observadas com alterações recorrentes dentro de seus grupos, sugerindo destaque para avaliação destas como potenciais biomarcadores no câncer de mama.

Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2) estavam mais expressos nas amostras CP 641L e CP 546L, quando comparados aos respectivos *spots* dos tumores primários de mama. O Inibidor de dissociação Rho GDP 2 (GDIR2), é codificado pelo *ARHGDIB*, também conhecido como gene Rho. Os genes, como *ARHGDIB*, pertencem à família das GDIs e tem um importante papel no crescimento celular normal. Codificam proteínas regulatórias que atuam primariamente controlando atividades de Rho-GTPases. A sinalização aberrante destas moléculas é comumente observada em alta porcentagem de cânceres humanos, e tem sido envolvida em praticamente todos os aspectos do fenótipo maligno, como: aumento da proliferação de células tumorais, promoção da angiogênese e aquisição de atividades metastáticas e invasivas (ZHANG, 2005). A maioria das Rho GTPases alterna entre a forma ativa (GTP-ligado) e inativa (GDP-ligado), em ciclo regulado por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e GAPs (*GTPase activating proteins*), além das GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) (HEASMAN & RIDLEY, 2008).

A expressão aumentada de RhoGDI em várias linhagens celulares induz a ausência de função das actinas do citoesqueleto e a perda da aderência ao substrato. Apresenta expressão aumentada em diversos tipos de cânceres humanos; incluindo os mamários. Também foram observados altos níveis de expressão de RhoGDI em linhagens celulares quimioresistentes, sugerindo que esta proteína desempenha um papel importante de resistência a drogas, protegendo as células cancerosas contra apoptose induzidas por diferentes agentes quimioterápicos (ZHANG *et al.*, 2005).

As amostras de tumores primários apresentaram nove bandas com valores de expressão aumentada recorrente em diferentes amostras, correspondentes a seis proteínas diferentes: Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PMSE2); Proteína 14-3-3 gama (1433G); Proteína 14-3-3 teta (1433T); Tropomiosina cadeia alfa 4 (TPM4); Serotransferrina (TRFE); e Vimentina (VIME).

O Complexo ativador do proteossoma, subunidade 1 (PSME1) e o Complexo ativador do proteossoma, subunidade 2 (PSME2), são codificados pelos genes *PSME1* e *PSME2*, ambos localizados no cromossomo 14q12. O proteossoma 26S é um complexo proteinase multicatalítico com uma estrutura altamente ordenada composta de 2 complexos, um núcleo 20S e um regulador 19S. Os proteossomas estão distribuídos por todas as células eucarióticas em alta concentração e atuam degradando peptídeos em um processo dependente de ATP / ubiquitina em uma via não-lisossomal. Uma função essencial do proteossoma modificado, os imunoproteossomas, é a transformação de peptídeos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Os imunoproteossomas contêm um regulador alternativo, conhecido como o regulador 11S ou PA28, que substitui o regulador 19S. Três subunidades (alfa, beta e gama) do regulador 11S foram identificados. O gene *PSME1* codifica a subunidade alfa do regulador 11S, enquanto o gene *PMSE2* codifica a subunidade beta do regulador 11S, induzidas pelo interferon-gama. No final, três subunidades alfa e beta se combinam para formar um anel heterohexamérico (*Uniprot*, 2011). Para desencadear uma resposta imune, receptores de células T precisam visualizar um epítopo na superfície da célula, apresentado pelo MHC. Embora ainda haja muito para ser elucidado a respeito da inter-relação do sistema imunológico com o câncer, os conhecimentos atuais sobre a resposta imune e anticorpos tumorais, originam amplas perspectivas de ação no sistema imunológico e na antigenicidade tumoral, com potencial para auxiliar no diagnóstico e terapia de diversas neoplasias (WEINBERG, 2008).

A família 14-3-3 é composta por proteínas diméricas, altamente conservadas, encontradas em plantas e mamíferos, codificadas por sete genes distintos em mamíferos (alfa/ beta, épsilon, eta, gama, tau/ teta, zeta/ delta e sigma) e estão presentes em praticamente todos os tecidos. Entre as proteínas identificadas, 14-3-3 gama é codificada pelo gene *YWHAG* (*tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide*), localizado no cromossomo 7q11.23. É induzida por fatores de crescimento humano em células musculares lisas

e também é altamente expressa no músculo esquelético e no coração, sugerindo um papel importante desta proteína no tecido muscular. Apresenta associação com RAF1 e proteína quinase C, envolvidas em vias diferentes de transdução de sinal (*Uniprot*, 2011). Uma característica das proteínas deste grupo é a capacidade de se ligarem com proteínas fosforiladas em resíduos de serina e treonina, além de moléculas sinalizadoras incluindo quinases, fosfatases, e receptores transmembrana. Esta interação com outras proteínas faz com que proteínas da família 14-3-3 desempenhem um papel importante nos processos regulatórios, como: transdução de sinal, divisão celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose, e câncer. As proteínas da família 14-3-3 apresentam ainda um efeito inibitório sobre a progressão do ciclo celular, mantendo, direta ou indiretamente, a ciclina-dependente de quinase Cdc2 em uma forma inativa, impedindo a progressão da fase G2-M. Também estimulam o fator de transcrição p53, resultando na inibição da transição da fase G1-S (HEMERT *et al.*, 2001).

Ainda, entre as proteínas diferenciais, foram identificadas quatro Tropomiosinas: TPM1, TPM2, TPM3 e TPM4. As Tropomiosinas estão entre as proteínas estruturais do citoesqueleto mais estudadas, e estão envolvidas em alterações neoplásicas e na organização específica de filamentos de actina. A redução da expressão de algumas isoformas é comumente associada ao fenótipo tumoral. Essas mudanças na expressão parecem contribuir para o rearranjo de microfilamentos, alterações morfológicas e aumento da motilidade celular. As tropomiosinas apresentam uma grande diversidade em termos de tamanho, afinidade de ligação à actina, localização celular e interações com outras proteínas (HELFMAN *et al.*, 2008). Os genes que codificam as quatro variantes protéicas identificadas, *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* e *TPM4*, estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 15q22.2, 9p13.3, 1q21.3 e 19p13.12.

A Serotransferrina (TRFE), codificada pelo gene *TF*, é uma glicoproteína com peso molecular aproximado de 76,5 kDa. A função desta proteína é o transporte de ferro do intestino, sistema reticuloendotelial, e de células do parênquima hepático para todas as células em proliferação no organismo. Esta proteína também pode ter uma função fisiológica importante associado a granulócitos / proteína de ligação do pólen (GPBP), envolvidos na remoção de matéria orgânica de determinados alérgenos do soro. Evidências destacam ainda a relação entre inflamação e câncer, em especial o câncer de mama. De particular

interesse, estudos sugerem uma ligação entre inflamação e o metabolismo do ferro em tumores. Acredita-se que a homeostase do ferro, quando desregulada, pode constituir a base para um microambiente inflamatório no tecido mamário, direcionando células ductais / estromais para uma transformação pré-maligna e evolução do câncer de mama (MANELLO *et al.*, 2011).

A vimentina (VIME) é codificada pelo gene *VIM* (*vimentin*), localizado no cromossomo 10p13, e apresenta MM e pl esperados de 53,68 kDa e 5,06, respectivamente. Em adultos, a VIME está presente em todas as células e tecidos mesenquimais e é frequentemente utilizada como um marcador de diferenciação. Como outros filamentos intermediários, a rede vimentina, está distribuída do núcleo para a membrana plasmática. Acredita-se que esta proteína atue como suporte, apoio mecanico-estrutural na célula, mantendo assim a integridade dos tecidos (MINAFRA *et al.*, 2006). Uma pequena heterogeneidade, contudo, foi observada neste trabalho em isoformas de vimentina, entre 10 *spots* com expressão aumentada de tumores primários, que apresentaram valores de MM e pl dentro dos parâmetros sugeridos por Dupont, *et al.* (2005) (FIGURA 02).

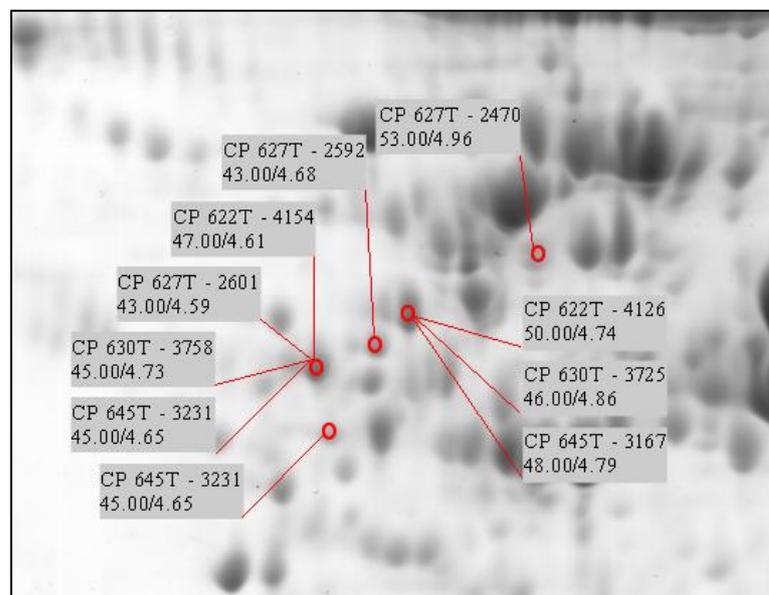


FIGURA 02 – PROTEÍNA VIMENTINA IDENTIFICADA EM DIFERENTES BANDAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA. As bandas correspondentes a proteína vimentina estão marcadas em vermelho e diferem quando a MM e pl. A referência da amostra e do *spot*, bem como os valores de MM e pl observados, aparecem descritos nas etiquetas.

FONTE: o autor (2011).

Alguns trabalhos revelaram várias outras funções-chave para a vimentina. VIME organiza uma série de proteínas críticas envolvidas na adesão, migração e sinalização celular. A fosforilação altamente dinâmica e complexa, como mecanismo de MPT, regula funções com amplas ramificações em diversos aspectos da fisiologia celular, de interações celulares e na homeostase de órgãos (IVASKA *et al.*, 2007). Embora os mecanismos exatos da função da vimentina ainda não estejam totalmente esclarecidos, as propriedades únicas acima descritas têm sido atribuídas à dinâmica desmontagem/montagem e reorganização espacial do citoesqueleto em resposta estímulos diversos (LAHAT *et al.*, 2010).

Análises de amostras pareadas de tumores primários de mama e linfonodos axilares da mesma paciente, como proposta deste trabalho, contribuem para a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de metástase, fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativa de um comportamento clínico particular de cada neoplasia (SUZUKI & TARIN, 2007; VECCHI, *et al.*, 2008). As aplicações de tecnologias proteômicas devem aproximar a ciência experimental e a medicina aplicada em descobertas relevantes para o câncer de mama, além de fornecer subsídios para o entendimento de eventos envolvidos na origem e evolução de tumores, como a proliferação celular desordenada e o processo metastático.

V. CONCLUSÃO

Devido à elevada variedade de proteínas expressas pelo genoma individual, e da complexidade humana em padrões proteômicos, decifrar parte significativa de proteínas complementares ao câncer é ainda uma expectativa distante. Os dados obtidos neste trabalho fornecem informações para estudos subseqüentes correlacionando proteínas diferenciais e o seu envolvimento na evolução de neoplasias, em variações interindividuais e intertumerais. Entretanto, para uma compreensão mais efetiva da participação destas proteínas no processo carcinogênico é necessário a complementação destes resultados através de novos estudos diferenciais de expressão proteômica, associados também à transcriptômica e genômica. Novas aplicações da proteômica tornam-se relevantes na identificação de potenciais biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e / ou como alvo terapêutico.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

DUPONT, A.; CORSEAUX, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A.L.; SUSEN, S.; VINCENELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, p. 585-596, 2005.

ELLSWORTH, R.E.; SEEBACH, J.; FIELD, L.A.; HECKMAN, C.; KANE, J.; HOOKE, J.A.; LOVE, B.; SHRIVER, C.D. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. **Clin Exp Metastasis**, v. 26, p. 205-213, 2009.

GRAVES, P.R. & HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n° 1, p. 39-63, 2002.

HEASMAN, S. J. & RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n° 9, p. 690-701, 2008.

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.

HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; HEUSDEN, G. P. H. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signaling and apoptosis. **Bioessays**, v. 23, n° 10, p. 936-946, 2001.

IVASKA, J.; PALLARI, H.M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 313, p. 2050-2062, 2007.

LAHAT, G.; ZHU, Q.S.; HUANG, K.L.; WANG, S.; BOLSHAKOV, S.; LIU, J.; TORRES, K.; LANGLEY, R.R.; LAZAR, A.J.; HUNG, M.C.; LEV, D. Vimentin Is a Novel Anti-Cancer Therapeutic Target; Insights from In Vitro and In Vivo Mice Xenograft Studies. **PLoS ONE**, v. 5, n° 4, p. 1-19, 2010.

LI, J.; GROMOV, P.; GROMOVA, I.; MOREIRA, J.M.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; RANK, F.; KAIWANG; LI, S.; LI, H.; WIUF, C.; YANG, H.; ZHANG, X.; BOLUND, L.; CELIS, J.E. Omics-based profiling of carcinoma of the breast and matched regional lymph node metastasis. **Proteomics**, v. 8, p. 5038-5052, 2008.

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, 2011.

MINAFRA, I.P.; 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.

NAKAGAWA, T.; HUANG, S.K.; MARTINEZ, S.R.; TRAN, A.N.; ELASHOFF, D.; YE, X.; TURNER, R.R.; GIULIANO, A.E.; HOON, D.S.B. Proteomic Profiling of Breast Cancer Predicts Axillary Lymph Node Metastasis. *Cancer Res*, v. 66, n° 24, p. 11825-11830, 2006.

POLYAK, K & KALLURI, R. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland development and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, p. 1-14, 2010.

SUZUKI, M. & TARIN, D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: Clinical implications. **Molecular Oncology**, v. 1, p. 172-180, 2007.

VECCHI, M.; CONFALONIERI, S.; NUCIFORO, P.; VIGANO, M.A.; CAPRA, M.; BIANCHI, M.; NICOSIA, D.; BIANCHI, F.; GALIMBERTI, V.; VIALE, G.; PALERMO, G.; RICCARDI, A.; CAMPANINI, R.; DAIDONE, M.G.; PIEROTTI, M.A.; PECE, S.; DI FIORE, P.P. Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. **Oncogene**, v. 27, p. 2148-2158, 2008.

WEINBERG, R.A. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ZARETSKY, J.Z. & WRESCHNER, D.H. Protein multifunctionality: Principles and mechanisms. **Translational Oncogenomics**, v. 3, p. 99-136, 2008.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; DAGHER, M. C.; SHACTER, E. Rho GDP Dissociation Inhibitor Protects Cancer Cells against Drug-Induced Apoptosis. **Cancer Research**, v. 65, n° 14, p. 6054-6072, 2005.

ANEXO I - Termo de Consentimento

ESTUDO: ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E METÁSTASES AXILARES CORRESPONDENTES

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: __/__/__

Prof. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro