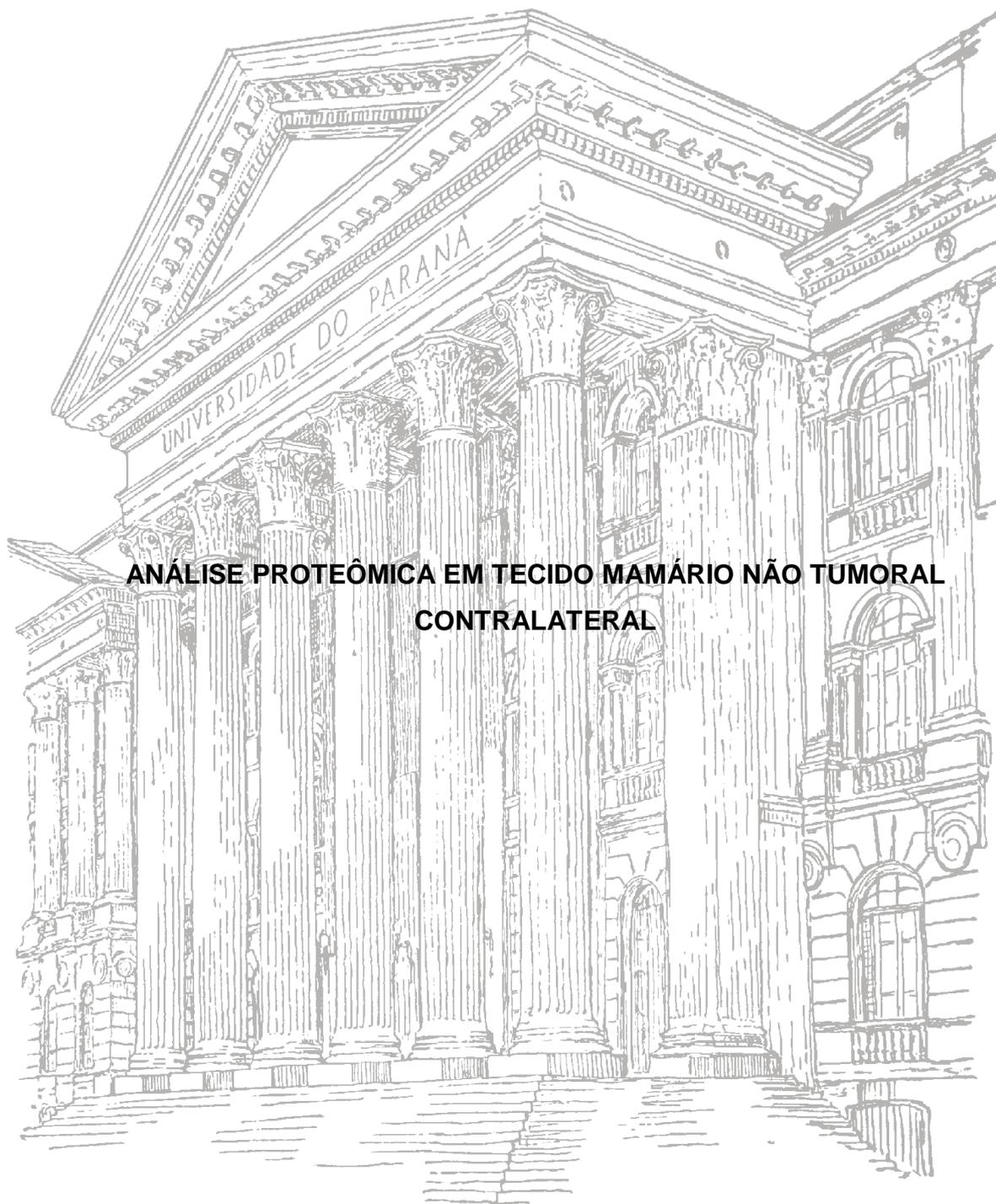


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TALITA HELEN BOMBARDELLI GOMIG



**ANÁLISE PROTEÔMICA EM TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL
CONTRALATERAL**

CURITIBA

2013

TALITA HELEN BOMBARDELLI GOMIG

**ANÁLISE PROTEÔMICA EM TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL
CONTRALATERAL**

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado em Biologia II como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2013



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



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

Aos vinte dias do mês de março de 2013 a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta pelos Professores Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro (orientadora), Roseli Wassem e Nina Amalia Brancia Pagnan, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia intitulada "Análise proteômica em tecido mamário normal contralateral", de autoria da acadêmica Talita Helen Bombardelli Gomig.

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

Prof.(a) Orientador(a)

Membro da Comissão

Membro da Comissão

Curitiba, 20 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro* e ao *Prof. Dr. Iglénir João Cavalli*, pela oportunidade e orientação conferida nestes quatro anos de graduação. É com grande satisfação que agradeço a dedicação, o carinho e a amizade dos orientadores, que estimo como exemplo para minha vida acadêmica.

À *Profa. Dra. Roseli Wassen* e à *Profa. Dra. Ana Cláudia Bonatto*, pela atenção e auxílio na parte técnica deste estudo, e por todo o conhecimento transmitido.

À todos os amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética e àqueles que já fizeram parte do nosso grupo de pesquisa, pela convivência, amizade e pelos momentos de descontração e alegria. Em especial, à *Karla* e ao *Gustavo*, pela disposição em ajudar, ouvir e incentivar, e pela amizade e companheirismo sem igual.

Às amigas *Andressa* e *Vanessa*, por todos os momentos compartilhados durante estes cinco anos de convivência. Ao *Leandro*, pela dedicação, amizade e parceria.

À minha família, pelo incentivo, carinho e auxílio em todos os momentos. Por confiarem e acreditarem na minha capacidade e permitirem a conclusão de tantos projetos pessoais e profissionais. Em especial, à minha mãe, *Elita*, pelo apoio e amor imensuráveis e por tantas vezes abdicar de suas tarefas para possibilitar o cumprimento das minhas e de meus sonhos. E à minha irmã, *Tamiris*, por toda a compreensão e amor e, principalmente, por me ensinar o que é amar incondicionalmente com nossa pequena *Larinha*.

Ao *Adriano*, pelo carinho, cumplicidade e companheirismo em todos esses anos. Agradeço pelas palavras de incentivo e por partilhar tantos momentos e conquistas.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A glândula mamária humana apresenta estrutura celular complexa, com um sistema integrado de renovação do tecido, controlado principalmente por hormônios e por fatores de crescimento. As constantes alterações na estrutura e nos níveis de fatores reguladores do desenvolvimento podem predispor o tecido a doenças mamárias, incluindo o câncer. O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, após o carcinoma de pele não melanoma. A tumorigênese mamária é um evento complexo, no qual diferentes proteínas estão envolvidas. O estabelecimento do perfil proteico para o tecido mamário não tumoral é fundamental para caracterizar a mama em estado saudável e possibilitar a inferência de alterações envolvidas na transformação e progressão neoplásica. Nesse contexto, a abordagem proteômica permite a identificação e a caracterização de potenciais biomarcadores que possam ser úteis para diagnóstico, terapêutica e prognóstico. No presente estudo, foi utilizada a eletroforese em gel bidimensional combinada com a espectrometria de massa para analisar o perfil de expressão proteica de quatro amostras de tecido mamário não tumoral da mama oposta àquela acometida pela neoplasia. A análise dos géis bidimensionais foi realizada no programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* e revelou 80 *spots* de interesse para a identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF) na plataforma MASCOT. Destes, 48 *spots* foram identificados e corresponderam a 36 proteínas diferentes, distribuídas em nove categorias funcionais: Citoesqueleto e proteínas associadas (25%); enzimas metabólicas (13,9%); chaperonas moleculares (2,8%); proteínas associadas à membrana, com múltiplas atividades (2,8%); proteínas com funções de ligação/ transporte (38,9%); reguladores do crescimento e proliferação celular (2,8%); detoxificação e proteínas redox (2,8%); biossíntese de proteínas (2,8%); e outras funções (8,3%). Estes dados fornecem informações adicionais para a caracterização do tecido mamário não tumoral. Entretanto, outras metodologias são necessárias para ampliar o conhecimento da mama saudável e possibilitar a construção de um mapa proteico desse tecido.

Palavras-chave: Glândula mamária; tecido mamário não tumoral contralateral; proteômica.

ABSTRACT

The human mammary gland presents a complex cellular structure, with an integrated system of tissue renewal, mainly controlled by hormone and growth factors. The continuous changes in the structure and in the levels of development-regulating factors may predispose the tissue to breast diseases, including cancer. Breast cancer is the second neoplasia most incident in the world and the commonest among women, after the nonmelanoma skin carcinoma. The mammary tumorigenesis is a complex event, in which different proteins are involved. The establishment of the protein profile to the non-tumoral breast tissue is essential to characterize the breast in healthy state to enable the inference of changes involved in the transformation and neoplastic progression. In this context, the proteomics approach enables the identification and characterization of potential biomarkers that may be useful for diagnosis, therapy and prognosis. In the present study, we used two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry to analyze the protein expression profile of four samples of non-tumoral breast tissue opposite to that breast affected by cancer. The analysis of two-dimensional gels was performed on ImageMaster™ 2D Platinum software v 6.0 and revealed 80 spots of interest for identification by *peptide mass fingerprint* (PMF) in platform MASCOT. We identified 36 different proteins from 48 spots, these proteins were distributed in nine functional categories: Cytoskeleton and associated proteins (25%); metabolic enzymes (13.9%); molecular chaperones (2.8%); membrane associated proteins, with multiple activities (2.8%); proteins with binding/transport functions (38.9%); growth regulators and cell proliferation (2.8%); detoxification and redox proteins (2.8%); protein biosyntheses (2.8%); and other functions (8.3%). These data provide additional information for the characterization of non-tumoral breast tissue. However, other methodologies are needed to expand the knowledge of healthy breast and allow the construction of a map of tissue protein.

Keywords: mammary gland; contralateral non-tumoral breast tissue; proteomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MAMA FEMININA	16
FIGURA 2 – ESTRUTURA DOS DUCTOS MAMÁRIOS	17
FIGURA 3 – ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO MAMÁRIO EM RATAS.....	18
FIGURA 4 - ESQUEMA DA MORFOGÊNESE EM CAMUNDONGOS.....	19
FIGURA 5 – MORFOGÊNESE DA RAMIFICAÇÃO MAMÁRIA EM ROEDORES	21
FIGURA 6 – CICLO GRAVIDEZ/LACTAÇÃO EM ROEDORES.....	22
FIGURA 7 – HABILIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS CANCEROSAS.....	27
FIGURA 8 – ALTERAÇÕES EPITELIAIS E ESTROMAIS NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO	29
FIGURA 9 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA	47
FIGURA 10 – ANÁLISE DOS GEIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA	51
FIGURA 11 – ESPECTROS DE MASSAS.....	55
FIGURA 12 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL 2D <i>MASTER</i>	57
GRÁFICO 1 - CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	38
QUADRO 2 – PROGRAMA PARA O <i>ETTAN IPGPHOR II</i> (TIRA DE 13CM; PH 4-7).....	40
QUADRO 3 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	45
QUADRO 4 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO	58
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA.....	16
2.1.1 Estrutura do tecido mamário.....	16
2.1.2 Desenvolvimento da glândula mamária	18
2.1.3 Regulação do desenvolvimento mamário	23
2.2 O CÂNCER.....	24
2.3 O CÂNCER DE MAMA.....	27
2.3.1 Aspectos Epidemiológicos.....	27
2.3.2 Carcinogênese mamária.....	28
2.3.3 Fatores de Risco para o Câncer de Mama	29
2.3.5 Incidência e epidemiologia do câncer de mama contralateral.....	31
2.4 ABORDAGEM PROTEÔMICA	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	38
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	38
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	39
4.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)	39
4.4.1 Primeira dimensão – Isoeletrofocalização (IEF)	39
4.4.2 Segunda Dimensão	40
4.4.2.1 Equilíbrio das Tiras de IPG.....	40
4.4.2.2 Preparação do Gel 2D e Corrida Eletroforética (2D-PAGE).....	41

4.5 FIXAÇÃO DAS PROTEÍNAS E COLORAÇÃO DO GEL 2D	41
4.6 DIGITALIZAÇÃO DO GEL 2D E ANÁLISE DAS IMAGENS	42
4.8 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL 2D	42
4.8.1 Excisão e Digestão dos <i>spots</i> de interesse.....	42
4.8.2 Análise dos espectros de massas.....	43
4.8.3 Identificação das proteínas.....	44
5 RESULTADOS	45
5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	45
5.2 CONFECÇÃO E ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	45
5.3 IDENTIFICAÇÃO PROTEICA.....	54
6 DISCUSSÃO	63
6.1 METODOLOGIA PROTEÔMICA.....	63
6.2 ANÁLISE PROTEÔMICA EM TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL	64
6.3 IDENTIFICAÇÃO PROTEICA.....	65
6.3.1 CLASSES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	66
6.3.1.1 Citoesqueleto e proteínas associadas.....	66
6.3.1.2 Enzimas metabólicas	69
6.3.1.3 Chaperonas Moleculares.....	71
6.3.1.4 Proteínas associadas a membrana com múltiplas atividades.....	71
6.3.1.5 Proteínas com funções de ligação/ transporte.....	72
6.3.1.6 Crescimento celular e reguladores da proliferação	76
6.3.1.7 Detoxificação e proteínas redox.....	77
6.3.1.8 Biossíntese de proteínas	77
6.3.1.9 Proteínas com outras funções.....	78
6.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM OUTRAS ANÁLISES PROTEÔMICAS REALIZADAS POR NOSSO GRUPO DE PESQUISA	79
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O tecido mamário possui uma estrutura complexa, apresentando alterações importantes em função da idade e do estado fisiológico. A exposição cíclica aos hormônios, aliada a reguladores da proliferação celular, determina as mudanças no número e composição celular, além de influenciar na arquitetura e funcionalidade da glândula (DJONOV, ANDRES e ZIEMIECKI, 2001). Essa complexidade implica na suscetibilidade a doenças mamárias (NAVARRETE *et al.*, 2005).

O câncer é caracterizado como uma doença multifatorial resultante de alterações genéticas e epigenéticas decorrentes do acúmulo de mutações em genes envolvidos no controle do ciclo celular, desencadeando uma proliferação desordenada da célula (PÉREZ-LÓPEZ, CHENDRAUI e HAYA, 2009).

Dentre os diversos tipos de neoplasias, o carcinoma mamário constitui a segunda forma mais frequente no mundo e a mais comum entre as mulheres. Anualmente, estima-se que cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA/MS, 2013), representando uma das principais causas de óbito entre a população feminina nos países ocidentais. No Brasil, as estimativas para os anos de 2012 e 2013 apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, sendo o de mama responsável por 52.680 destes, com um risco estimado de 52 casos para cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2013).

Apesar de ser considerado um carcinoma de prognóstico relativamente bom, se detectado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade pela doença encontram-se elevadas no Brasil, devido ao diagnóstico tardio, já em estágios avançados da neoplasia.

Estudos genômicos e proteômicos têm permitido uma melhor compreensão dos processos e eventos neoplásicos, podendo auxiliar no diagnóstico e na terapêutica, de modo diferencial. Nesse sentido, a caracterização do perfil proteômico torna-se um poderoso método para a elucidação de mecanismos peculiares ao câncer, além da identificação de potenciais biomarcadores da doença.

Análises proteômicas, comparando amostras de carcinomas mamários e de tecidos não tumorais, demonstram que determinadas proteínas apresentam uma expressão diferenciada nestes tecidos, sendo que modificações de expressão podem desempenhar papéis importantes na tumorigênese do câncer de mama (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

A caracterização do tecido mamário é uma das etapas iniciais para o entendimento da biologia da glândula mamária saudável e um meio eficaz de investigar possíveis alterações relacionadas ao processo de carcinogênese. A obtenção do perfil proteico do tecido contralateral à mama acometida pela neoplasia fornece informações relevantes sobre o tecido mamário não tumoral, uma vez que sua localização apresenta uma distância considerável em relação ao tumor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA

2.1.1 Estrutura do tecido mamário

A glândula mamária humana é composta por um sistema ducto-lobular ramificado e um estroma de tecido conectivo e adiposo com alta vascularização (NANDI, 1995; TOILLON *et al.*, 2007).

O tecido mamário é constituído pela porção glandular ou epitelial, drenada por um sistema de ductos responsáveis pelo transporte de leite, e pelos tecidos estromais e conectivos (FIGURA 1). Nas mulheres, a parte glandular apresenta 15 a 20 lobos, dentro dos quais existem muitos lóbulos pequenos, que contém de 10 a 100 alvéolos, cujas células secretoras são responsáveis pela produção do leite materno (HONDERMARK, 2003; HASSIOTOU e GEDDES, 2012). Os lóbulos são interligados através de ductos e, estes, conduzem o leite ao mamilo (HONDERMARCK, 2003).

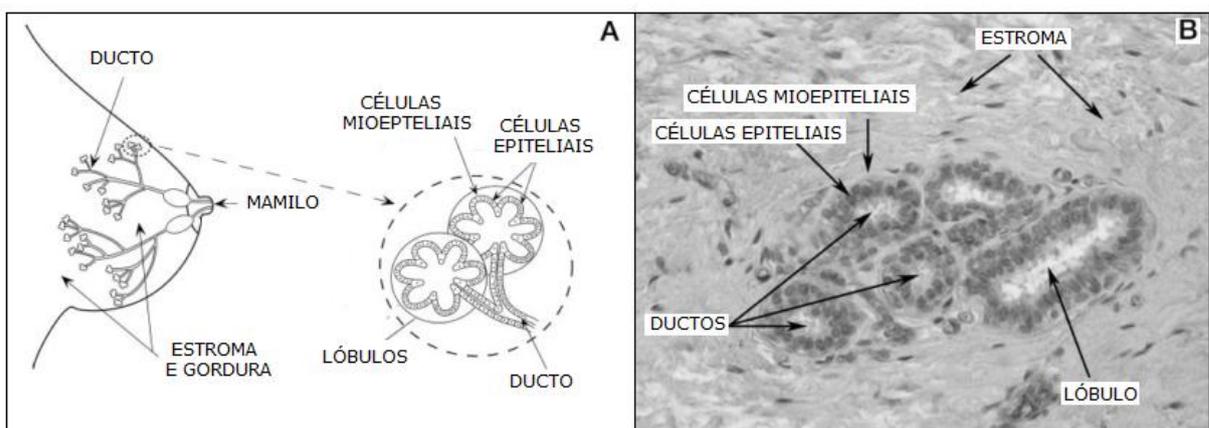


FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MAMA FEMININA

FONTE: Adaptado de Hondermarck (2003)

NOTA: (A) Esquema anatômico e (B) corte histológico da glândula mamária humana.

Os ductos e lóbulos mamários maduros são revestidos por duas camadas de células epiteliais: uma camada exterior de células mioepiteliais, separadas do estroma intersticial por uma membrana basal íntegra, que contém populações de células-tronco mamárias (*mammary stem cells* – MaSC) bipotentes; e um

revestimento interno de células luminais, algumas das quais com potencial de diferenciação em células secretoras de leite (lactócitos), durante o período de lactação (FIGURA 2) (VISVADER, 2009; GJOREVSKI e NELSON, 2011).

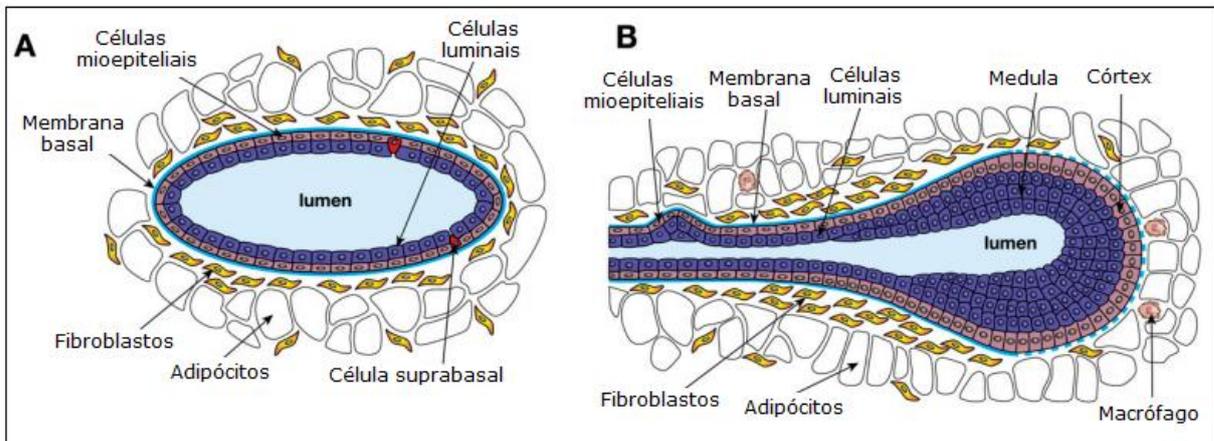


FIGURA 2 – ESTRUTURA DOS DUCTOS MAMÁRIOS

FONTE: Visvader (2009)

NOTA: (A) Representação esquemática do ducto mamário e (B) terminações dos brotos mamários finais (*termini end buds* – TEBs).

Envolvendo o sistema ducto-lobular há um complexo estroma, que corresponde a mais de 80% do volume da mama (RONNOV-JESSEN *et al.*, 1996), contendo fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e várias células do sistema imune, todos componentes importantes para a função e desenvolvimento mamários normais (GJOREVSKI e NELSON, 2011). Nele também existem células mesenquimais que são altamente responsivas à sinalização hormonal do microambiente (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

Analogamente ao hematopoiético, o tecido mamário apresenta uma organização hierárquica de tipos celulares. Isso porque o mesmo apresenta uma dinâmica celular ao longo do tempo, com uma massa de células diferenciadas que perdem a capacidade de proliferar e, então, são substituídas através de um processo regulado de proliferação, sobrevivência e diferenciação contínua a partir de MaSCs. Estas, sob condições normais, geram células-filhas com potencialidades mais restritas, mantendo a integridade funcional do tecido, além de se autorreplicar. A aparente irreversibilidade da maioria dessas mudanças constitui a hierarquia celular mamária (STINGL *et al.*, 2006).

As MaSCs originam o epitélio maduro de ambas as linhagens, luminal e mioepitelial, através de uma série de intermediários. A linhagem luminal é ainda

subdividida em ductal e alveolar. Além da manutenção da homeostase desse tecido, as células-tronco também estão envolvidas na expansão do epitélio mamário durante a puberdade e gravidez (VISVADER, 2009).

2.1.2 Desenvolvimento da glândula mamária

O desenvolvimento do tecido mamário é semelhante entre os mamíferos e várias informações já foram obtidas através de estudos com murinos (NGUYEN *et al.*, 1995).

O curso do desenvolvimento mamário humano pode ser descrito em estágios diferencialmente regulados, incluindo a fase embrionária, neonatal/pré-puberal e pós-puberal, além da involução pós-menopausa. Também pode passar por ciclos de gravidez/lactação (*pregnancy and lactation cycle* – PLC), caracterizados por remodelamento e posterior involução (pós-lactação) (FIGURA 3) (GEDDES, 2007; GJOREVSKI e NELSON, 2011).

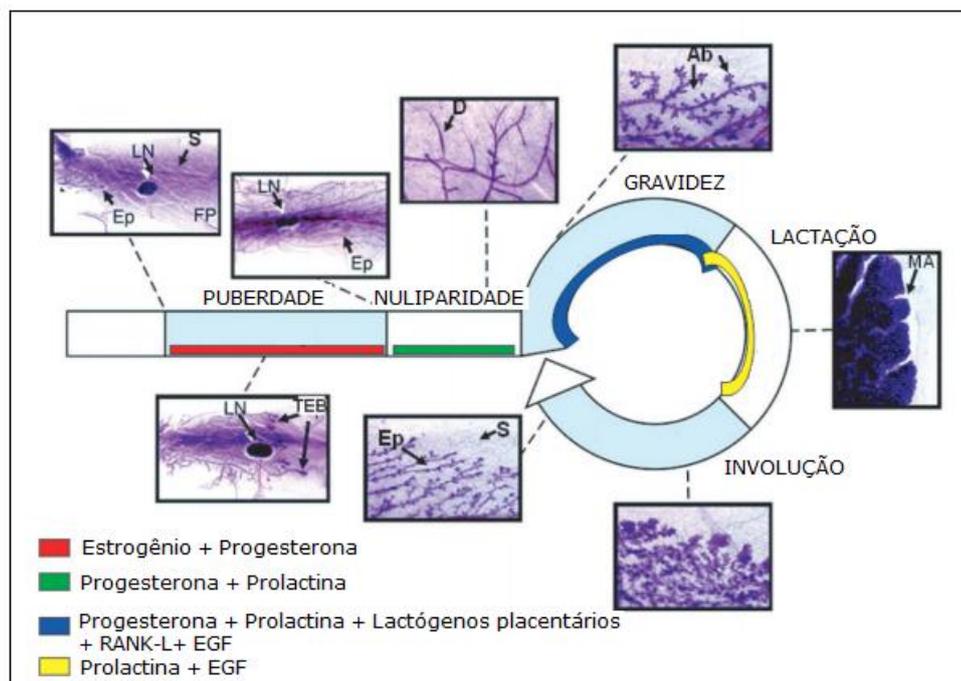


FIGURA 3 – ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO MAMÁRIO EM RATAS

FONTE: Silveri *et al.* (2006)

NOTA: Esquema ilustrando os estágios de desenvolvimento mamário. Os principais hormônios que controlam os processos de proliferação, diferenciação e apoptose bem como a fase na qual atuam estão indicados em cores diferentes.

LEGENDA: **Ab**: broto alveolar; **D**: ducto; **Ep**: epitélio; **FP**: tecido adiposo; **LN**: linfonodo; **MA**: alvéolo maduro; **S**: estroma; **TEB**: terminações dos brotos finais.

Em camundongos, o desenvolvimento mamário do embrião é iniciado em meados da gestação com a formação de cinco pares de placódios (espessamentos epiteliais no embrião que originam um determinado órgão), a partir de cristas epidérmicas bilaterais. Estes invaginam para formar os brotos mamários, que entram no mesênquima (estroma embrionário) subjacente e no aglomerado de pré-adipócitos, os quais dão origem ao corpo adiposo da mama. Em seguida, um número limitado de ramos proliferam do primórdio mamário, gerando uma estrutura ductal rudimentar que, após o nascimento, devido à diminuição das influências maternas, entra em uma fase de quiescência morfogênica até a puberdade (FIGURA 4) (STERNLICHT, 2005; GJOREVSKI e NELSON, 2011). Segundo Howard e Gusterson (2000), o desenvolvimento mamário humano pouco difere do descrito acima.

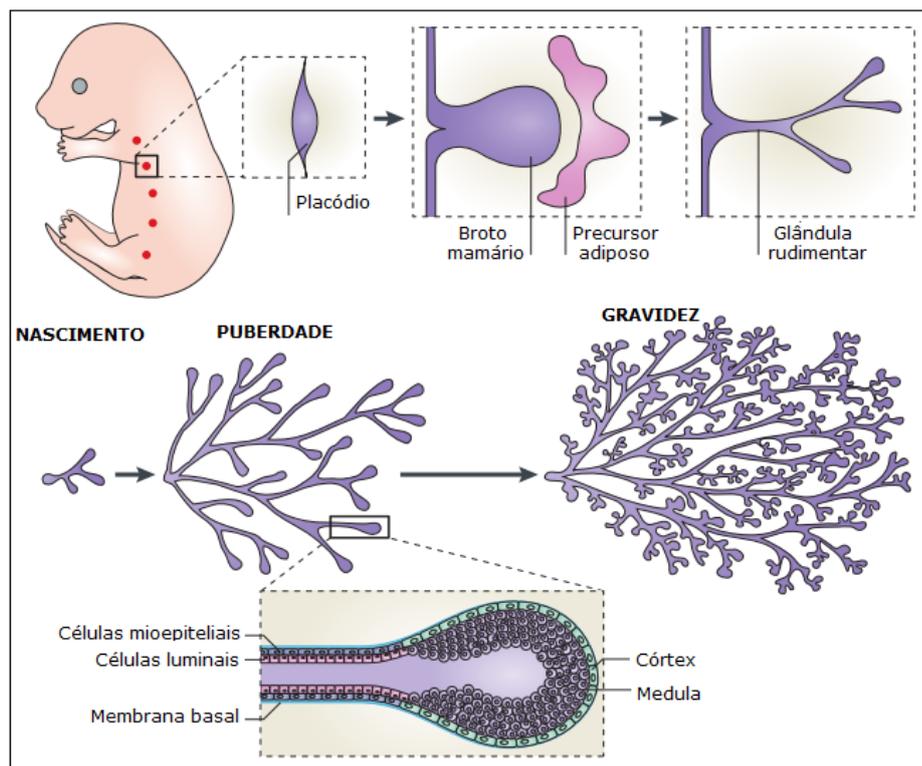


FIGURA 4 - ESQUEMA DA MORFOGÊNESE EM CAMUNDONGOS
 FONTE: GJOREVSKI E NELSON (2011)

Até a puberdade, o desenvolvimento mamário humano é indistinguível entre homens e mulheres. Após esse estágio, a glândula mamária das mulheres passa por um “mini-remodelamento” a cada ciclo menstrual, o qual não regride completamente ao final do ciclo. Assim, o desenvolvimento é contínuo a partir da

adolescência e persiste até aproximadamente os 35 anos de idade (RUSSO e RUSSO, 2004). No entanto, tais mudanças ainda não resultam no remodelamento completo alcançado durante a gravidez/lactação, na qual ocorrem transformações gradativas que determinam a maturidade funcional do órgão (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

A puberdade é o estágio mais marcante da morfogênese mamária, uma vez que o aumento nos níveis dos hormônios ovarianos, incluindo o estrogênio, promove a proliferação dos ductos rudimentares em estruturas epiteliais complexas, expandindo substancialmente a população celular do tecido mamário (KIM *et al.*, 2008; GJOREVSKI e NELSON, 2011). Estudos de proteoma evidenciaram a expressão proteica diferencial entre ratas nos estágios pré e pós-puberdade (KIM *et al.*, 2008).

A puberdade induz um rápido crescimento da glândula mamária em função da ovulação e do estabelecimento de ciclos menstruais regulares, sendo que o aumento no tamanho se dá principalmente pela deposição de tecido adiposo (RUSSO *et al.*, 1987). As mudanças incluem o alongamento dos ductos existentes e a ramificação destes em ductos secundários e terciários, cujos brotos terminais formam as unidades lobulares. Estas últimas, contendo estruturas alveolares rudimentares, também são chamadas de brotos alveolares (ANDERSON *et al.*, 2007).

A morfogênese da ramificação mamária não se restringe ao compartimento epitelial, uma vez que concomitante a este processo ocorre a expansão do estroma mamário, através de atividades de remodelamento de matriz (RUSSO e RUSSO, 2004; ANDERSON *et al.*, 2007).

Assim, ciclos sucessivos de alongamento, bifurcação e ramificação lateral resultam na formação de uma “árvore” epitélio-ductal, com estruturas lobulares, características do tecido mamário maduro (FIGURA 5) (GJOREVSKI e NELSON, 2011).

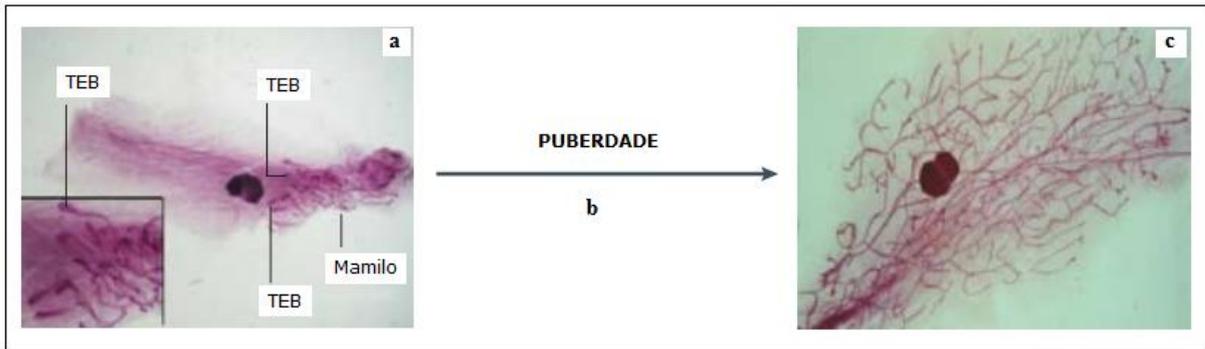


FIGURA 5 – MORFOGÊNESE DA RAMIFICAÇÃO MAMÁRIA EM ROEDORES

FONTE: Adaptado de Smalley e Ashworth (2003)

NOTA: Estrutura mamária ductal na terceira semana embrionária em roedores, com as terminações dos brotos finais (TEBs) formando as pontas dos ductos. Detalhe: (A) Ampliação da região dos brotos finais. (B) Durante a puberdade, os TEBs se deslocam através do tecido adiposo para as ramificações dentro da glândula. (C) A glândula mamária adulta de uma fêmea nulípara consiste em um sistema de ramificação ductal disposto dentro do tecido adiposo e contém poucos brotos alveolares.

A glândula mamária atinge a maturidade funcional apenas durante a gestação/lactação, contrastando com a maioria dos órgãos do corpo, cujo estado relativamente maduro é alcançado durante a vida embrionária (HARTMANN, 2007).

O ciclo de gravidez/lactação é marcado por um remodelamento tecidual massivo, no qual, primeiramente, ocorre a proliferação celular de MaSCs e progenitores celulares resultando no desenvolvimento de novos ductos, alongamento e extensiva ramificação destes bem como formação e expansão dos alvéolos nos brotos terminais (morfogênese alveolar/mamogênese) (FIGURA 6). Estes constituem as unidades secretoras lubuloalveolares, capazes de produzir e secretar leite. A morfogênese alveolar consiste na etapa de diferenciação das células da camada luminal em lactócitos (OAKES, HILTON e ORMANDY, 2006). O aumento no número de células epiteliais bem como na área de superfície epitelial é essencial para a produção de leite suficiente durante a lactação (STERNLINCHT, 2006).

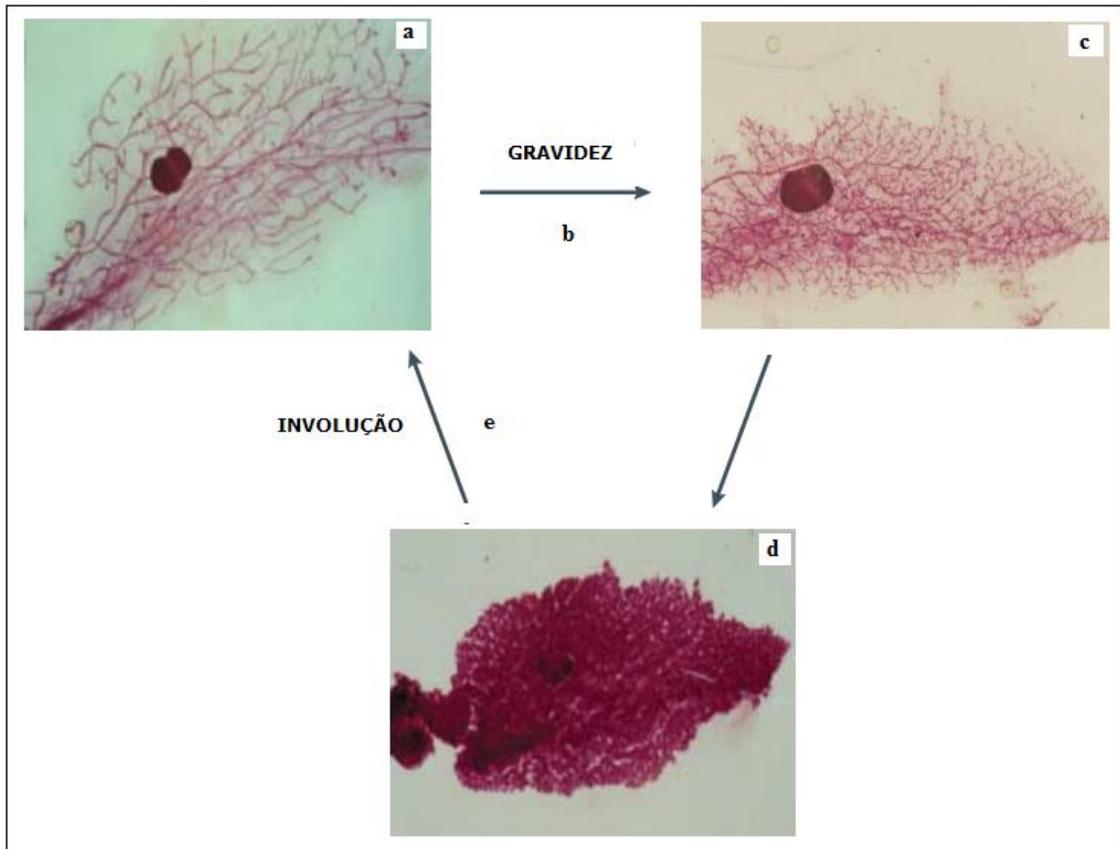


FIGURA 6 – CICLO GRAVIDEZ/LACTAÇÃO EM ROEDORES

FONTE: Adaptado de Smalley e Ashworth (2003)

NOTA: (A) Estrutura da glândula mamária adulta não funcional. (B) O ciclo gravidez/lactação iniciado com a gravidez determina o completo remodelamento do órgão. (C) Em ratos, na metade da gestação a glândula mamária consiste em ramos ductais secundários e aumento no número de estruturas alveolares. (D) Na fase de lactação, a glândula apresenta somente alvéolos secretores. (E) Após a gravidez, o desmame desencadeia a eliminação do epitélio secretor por apoptose e a glândula passa por um remodelamento que a restaura ao estado não funcional.

A expansão do epitélio mamário é acompanhada por mudanças em outros compartimentos da glândula, como no tecido adiposo, que perde seu conteúdo lipídico e permanece como longas projeções dispersas no epitélio alveolar. Também ocorre a ampliação da vascularização estromal, necessária para aumentar o aporte de energia, açúcares, aminoácidos e outros solutos requeridos para a produção de leite (NEVILLE, 1998; DJONOV, ANDRES e ZIEMIECKI, 2001).

O remodelamento tecidual durante a gravidez também é de natureza cíclica, pois a perda do estímulo de sucção do leite (desmame) faz com que quase todo o desenvolvimento induzido nessa fase seja desativado por morte celular programada (apoptose) durante a fase de involução pós-gestacional, voltando a se desenvolver na próxima gravidez (OAKES, HILTON e ORMANDY, 2006).

A involução da glândula mamária após a gravidez constitui um processo essencial de desobstrução dos alvéolos mamários, removendo os lactócitos quando estes se tornam redundantes com o desmame, o que permite sua restauração ao estado de repouso. No entanto, a estrutura e a morfologia da glândula mamária não são mais idênticas às daquelas do estado de nuliparidade (HUGHES *et al.*, 2012; WATSON, 2006).

A involução mamária está associada a uma extensa morte celular e a aquisição de um padrão inflamatório, incluindo infiltração de macrófagos e mastócitos, cuja função fagocitária é um importante constituinte do processo de remodelamento (HUGHES *et al.*, 2012). O processo culmina na remoção de cerca de 80% desse epitélio (GJOREVSKI e NELSON, 2011).

Já a involução mamária pós-menopausa é desencadeada pela diminuição da função ovariana e a consequente queda dos níveis de hormônios esteroides sexuais, determinando a regressão e atrofia do tecido glandular e aumento do tecido adiposo circundante. A redução do primeiro pode ser acima de um terço do volume original da mama, enquanto que a quantidade do tecido adiposo circundante pode variar entre as mulheres durante este período (HUTSON *et al.*, 1985; TAVASSOLI, 1992; HASSIOTOU e GEDDES, 2012). Os efeitos da menopausa, entretanto, podem ser minimizados pela terapia de reposição hormonal (HRT).

2.1.3 Regulação do desenvolvimento mamário

A proliferação e diferenciação do tecido mamário humano apresentam um controle dinâmico, incluindo sinalização hormonal, de células vizinhas (moléculas relacionadas à interação célula-célula) e de componentes do microambiente, como fatores de crescimento (PAGE *et al.*, 1999; HONDERMARCK, 2003). Tais interações permitem o remodelamento cíclico, característico do tecido mamário (HONDERMARCK, 2003).

O desenvolvimento da glândula mamária dependente de hormônio ocorre a partir da puberdade e envolve aqueles produzidos pela hipófise: prolactina (PRL) e hormônios do crescimento (GH), luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH); e pelos ovários: estrogênio e progesterona (BRISKEN e O'MALLEY, 2010). Durante a puberdade, o estrogênio e a progesterona aceleram o alongamento e a ramificação

ductal. Já durante a gravidez, a prolactina e os lactógenos placentários controlam a proliferação e a maturação alveolar.

Além da ação hormonal, diversas famílias de fatores de crescimento são importantes para o desenvolvimento mamário, dentre as quais se destacam as do fator de crescimento epidermal/ fator de crescimento transformador α (EGF/TGF α), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (NANDI *et al.*, 1995).

O padrão de extensão dos ductos é regulado por inibição local, através de um circuito dependente de fator de crescimento transformante β (TGF- β), no qual este é indicado como o inibidor local primário do alongamento dos ductos e ramificação lateral, contribuindo para a arquitetura da glândula (SILBERSTEIN, 2001).

O hormônio pituitário prolactina e o ovariano progesterona, estão associados com a morfogênese alveolar, característica da fase gestacional/lactacional. Os níveis de prolactina são altos no início da gravidez e auxiliam na manutenção dos níveis de progesterona requeridos nesta fase, diminuindo gradualmente com o progresso da lactação. A prolactina, por sua vez, estimula a morfogênese alveolar. Assim, a formação das estruturas produtoras de leite é dependente de uma sinalização sinérgica entre ambos os hormônios (BRISKEN *et al.*, 1998; NEVILLE, MCFADDEN e FORSYTH, 2002; HASSIOTOU e GEDDES, 2012). O neuropeptídeo galanina (Gal) também tem ação sobre o epitélio mamário na formação das estruturas lobuloalveolares, além de regular a secreção de prolactina pelos lactotrófos pituitários (NAYLOR *et al.*, 2003).

Além dos fatores citados acima, a idade e o uso de contraceptivos orais modificam os processos de proliferação, diferenciação e apoptose que ocorrem no tecido mamário (NAVARRETE *et al.*, 2005).

2.2 O CÂNCER

O termo “câncer” é utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças comumente caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela proliferação de células anormais (INCA/MS, 2013).

Um tumor é considerado benigno quando as células neoplásicas permanecem agrupadas em uma massa única semelhante ao tecido adjacente

(células diferenciadas), com taxa de proliferação aumentada. Um tumor maligno apresenta taxa de proliferação maior que o benigno, diferenciação morfológica variável (desde células bem diferenciadas até indiferenciadas) e possui capacidade de invasão no tecido não tumoral e metastatização (ALBERTS *et al.*, 2004). Somente tumores malignos são considerados cânceres.

Acredita-se que o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas seja responsável por determinar a progressão de células normais, através de estágios hiperplásicos e displásicos, em um câncer invasivo e, finalmente, em uma doença metastática (GARNIS *et al.*, 2004). Este processo ocorre por alterações de proteínas ao longo de múltiplas vias que, em conjunto, conduzem à proliferação, diferenciação da massa, ou inibem a apoptose, conferindo “imortalidade” às células anormais. Cada um desses processos celulares é regulado por redes complexas de proteínas com múltiplas interconexões de atividade. Teoricamente, uma proteína aberrante que tenha função-chave nestas redes pode afetar o fluxo de informações a jusante (CALVO *et al.*, 2005; SOMIARI *et al.*, 2005).

O câncer resulta de um processo de múltiplas etapas, incluindo o acúmulo de alterações em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Nas mutações de ganho de função o produto funcional mutante adquire novas características, como ocorre na ativação de oncogenes, em que a proteína codificada (oncoproteína) geralmente tem sua função aumentada. Nas mutações de perda de função, ambos os alelos de um gene perdem a função e a proteína resultante não é sintetizada, ou a síntese ocorre em pequena taxa, insuficiente para desempenhar sua função biológica. Genes supressores de tumor são um exemplo (NUSSBAUM, MCINNES e WILLARD, 2002).

Os proto-oncogenes estão localizados em diversos sítios do DNA e seus produtos regulam a cascata de eventos que controla a progressão do ciclo celular, divisão e diferenciação celular, resultando na ativação e repressão alternada de diversos genes (LOURO *et al.*, 2002). Quando mutados, os proto-oncogenes se transformam em oncogenes, os quais codificam oncoproteínas, que são versões alteradas das proteínas normais, e podem descontrolar a proliferação celular interagindo em qualquer fase da divisão celular (WEINBERG, 1985; SUGIMURA, 1998). A nível celular, trata-se de genes dominantes, quando um único alelo mutado é suficiente para desencadear a superexpressão de seu produto e a multiplicação desordenada da célula, característica da célula cancerosa.

Já os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo, bloqueando a diferenciação ou induzindo a apoptose. Alterações que inativam estes genes liberam a célula dessa inibição em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), culminando na proliferação celular desordenada (WEINBERG, 1991). São genes recessivos a nível celular, uma vez que a função somente é perdida quando ambos os alelos são inativados (BIÈCHE et al., 1993).

Knudson (1971) elaborou a Teoria dos dois eventos ("*Two Hits Model*") para explicar a ocorrência esporádica e familiar do retinoblastoma, um raro câncer intra-ocular da infância. Segundo o modelo, são necessários dois eventos mutacionais para o desenvolvimento do câncer. Nos hereditários a primeira mutação é transmitida pela linhagem germinativa e a segunda é somática. Para os cânceres esporádicos as duas mutações ocorrem no tecido somático como eventos independentes (KNUDSON, 1971, *apud* NUSSBAUM et al., 2001).

As principais anormalidades genéticas observadas no câncer incluem expressão aumentada de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, instabilidades cromossômicas, alterações epigenéticas e nos genes de reparo de DNA, bem como disfunção da telomerase, eventos que resultam na desregulação do crescimento celular, proliferação celular, seleção clonal e na formação do tumor (GARNIS et al., 2004; GILLEY et al., 2005; GALVÃO et al., 2011).

Hanahan e Weinberg (2000) sugerem que uma série de condições essenciais são adquiridas pelas células cancerosas no decorrer da tumorigênese (FIGURA 7), incluindo a redução da dependência de promotores de crescimento exógenos e concomitante resistência a fatores inibitórios de crescimento, suscetibilidade reduzida a apoptose, habilidade de não reconhecimento pelo sistema imune e, portanto, não ser eliminada por este, capacidade de multiplicação indefinida (imortalidade) e de angiogênese bem como potencialidade invasiva e metastática.

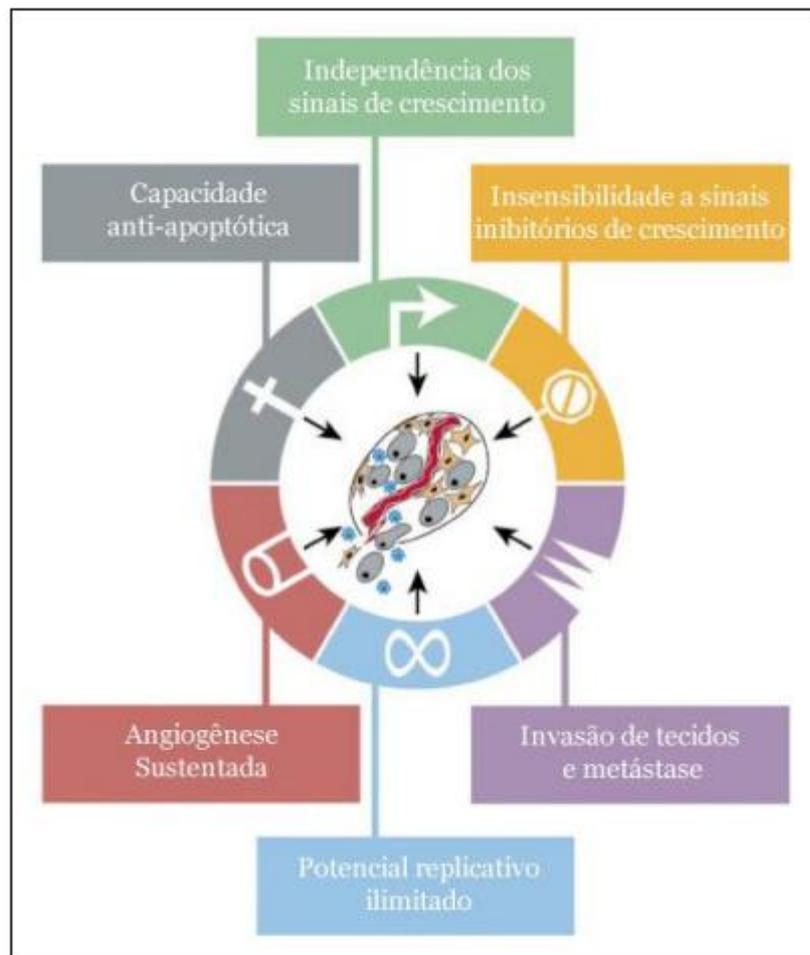


FIGURA 7 – HABILIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS CANCEROSAS
 FONTE: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2000)

2.3 O CÂNCER DE MAMA

2.3.1 Aspectos Epidemiológicos

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres e a forma mais letal para o sexo feminino, sendo a causa mais frequente de morte associada ao câncer em mulheres no mundo (AIHW, 2010; BRISKEN e O'MALLEY, 2010; OMS, 2013).

Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), válidos para os anos de 2012 e 2013, estimam incidência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer

(incluindo os casos de pele não melanoma, de maior incidência). Destes, são esperados 52.680 casos novos de câncer da mama, o que representa um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres.

PIETROWSKA e colaboradores (2009) indicam a necessidade de identificação de novos marcadores moleculares que proporcionem detecção e diagnóstico mais eficazes, uma vez que mais de 20% dos novos casos da doença não são detectados pelas técnicas de imagem convencionais, como a mamografia, a ultrassonografia e a ressonância magnética.

2.3.2 Carcinogênese mamária

A carcinogênese mamária é caracterizada por vários estágios, incluindo imortalidade celular, hiperplasia, tumorigenicidade e invasividade (MEDINA, 1996). Os eventos que conduzem à malignidade levam a mudanças nos processos celulares, como proliferação celular, apoptose e angiogênese, resultando na aquisição de fenótipo maligno (GALVÃO *et al.*, 2011).

As primeiras lesões estruturalmente evidentes constituem as hiperplasias intraductais, nas quais o epitélio apresenta alterações em sua estrutura, mas não atipia citológica, contendo poucas alterações genéticas (FIGURA 8). Tais hiperplasias avançam a um estado de atipia celular e oclusão dos ductos, resultando em um carcinoma intraductal *in situ* (CIS). Neste, a atipia é mais evidente e há um aumento significativo da atividade mitótica epitelial e das alterações genéticas. O processo progride a carcinoma localmente invasivo (CI), no qual a membrana basal é rompida e as células epiteliais invadem o estroma circundante, com possibilidade de metástase para vários órgãos, como pulmões, ossos e fígado (MEDINA, 1996; TLSTY *et al.*, 2004).

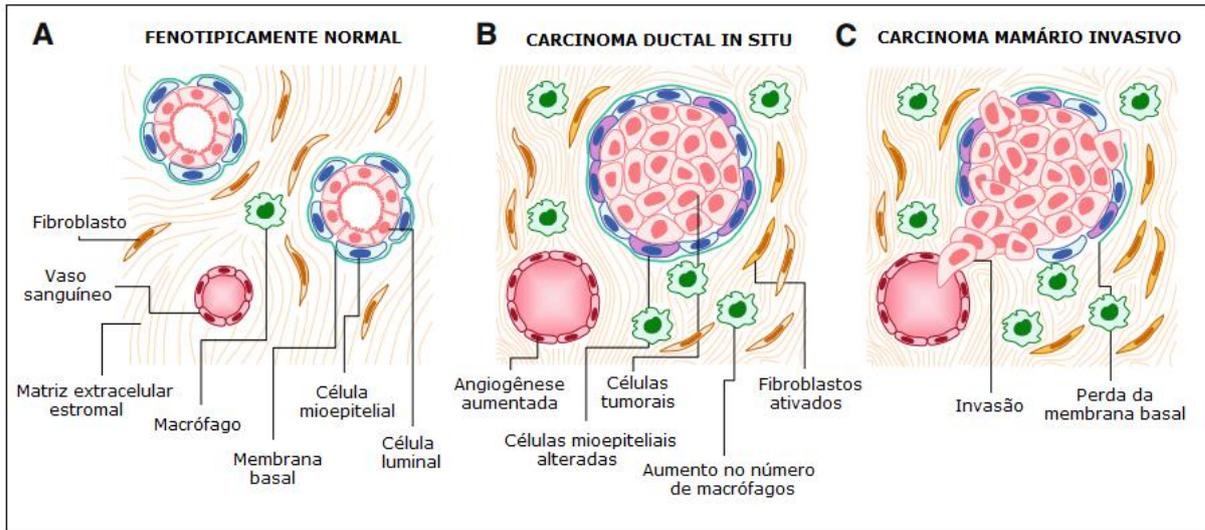


FIGURA 8 – ALTERAÇÕES EPITELIAIS E ESTROMAIS NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: Cichon *et al.* (2010)

NOTA: Representação esquemática (A) do tecido mamário fenotipicamente normal, com as estruturas epiteliais consistindo em células luminais centrais rodeadas por células mioepiteliais, incluídas em uma membrana basal contínua, enquanto o estroma contém fibroblastos, células imunes e vasculatura; (B) progressão a carcinoma *in situ*, caracterizado pelo epitélio proliferativo contido em uma membrana basal ainda íntegra, e aumento nas populações celulares estromais e na angiogênese; (C) o carcinoma invasivo é definido pelo rompimento da membrana basal e pela perda de células mioepiteliais, com a consequente invasão das células epiteliais no estroma e na circulação.

O carcinoma mamário também é caracterizado pela heterogeneidade tumoral, cuja composição celular variável implica em morfologias distintas e comportamentos biológicos diferentes em termos de gravidade, curso e resposta à terapia, refletindo, também, a imprevisibilidade da resposta imune individual (VAN'T VEER *et al.*, 2003; CAMPBELL e POLYAK, 2007).

2.3.3 Fatores de Risco para o Câncer de Mama

A etiologia da neoplasia mamária é multifatorial, com fatores genéticos, ambientais, comportamentais e reprodutivos interagindo de uma forma complexa (GALVÃO *et al.*, 2011).

O risco de desenvolver câncer de mama no sexo feminino está relacionado à história reprodutiva e ao tempo de exposição hormonal, uma vez que hormônios também podem influenciar o curso da doença, particularmente o estrogênio (BRISKEN e O'MALLEY, 2010). Casos de menarca precoce (antes dos 11 anos), menopausa tardia (após os 50 anos), primeira gestação após os 30 anos e

nuliparidade apresentam maior risco de desenvolver a doença. Hormônios exógenos, provenientes de contraceptivos orais, de terapias de reposição hormonal e da dieta também acentuam a exposição ao estrogênio (PARKIN *et al.*, 2005).

Dentre os fatores envolvidos no controle do desenvolvimento da glândula mamária, o estrogênio é um dos principais moduladores do risco de desenvolver a doença, uma vez que estimula a divisão celular do tecido mamário, fato que aumenta o risco de ocorrência de danos permanentes ao DNA, principalmente em mulheres jovens, pois as células do tecido mamário não se encontram totalmente maduras e, não possuindo mecanismos eficientes de reparo do DNA, este pode se ligar mais frequentemente a carcinógenos (CHABNER e MURPHY, 2005; HONDERMARCK *et al.*, 2008).

As células epiteliais do tecido mamário respondem às flutuações hormonais do ciclo menstrual e dos processos de gestação/lactação através de proliferação, diferenciação ou morte celular programada (apoptose). Este repetido ciclo de mudanças, que ocorre entre os 15 e 50 anos de idade, propicia muitas oportunidades para que ocorram pequenas disfunções (CHABNER e MURPHY, 2005). O risco de que ocorram disfunções no tecido mamário também é aumentado pela involução concomitante que ocorre entre os 35 e 55 anos de idade. Tal processo é altamente dependente da relação entre o epitélio e o estroma mamários (HUGHES, 2000).

A idade é um importante fator de risco para os cânceres em geral, uma vez que estes ocorrem em função do acúmulo de mutações nas células durante as divisões celulares (INCA/MS, 2013).

Fatores genéticos também estão associados a maiores riscos de carcinogênese. História familiar positiva, especialmente nos casos de parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) afetados, constitui um importante elemento de risco. Mulheres que apresentam mutação em genes de suscetibilidade, como o *BRCA1* e *BRCA2*, apresentam 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INCA/MS, 2013).

A obesidade também tem sido associada ao aumento do risco de câncer, sendo que existe uma forte correlação entre peso corporal e câncer de mama, uma vez que o tecido adiposo é uma importante fonte de estrogênio (KEY *et al.*, 2003; WHO, 2013).

Outros fatores relevantes no câncer de mama, podendo influenciar o seu desenvolvimento, são a exposição à radiação ionizante, ao tabaco, o consumo regular de álcool (mesmo que em quantidade moderada), o sedentarismo e uma dieta rica em gorduras.

Alguns fatores conferem proteção ao câncer de mama, como a gravidez, a amamentação por um longo período de tempo e a prática de atividades físicas (OLDENBURG *et al.*, 2007; WHO, 2013).

De fato, considera-se que a iniciação do câncer de mama está associada com o grau de maturidade da glândula mamária. Com a gravidez, há uma depleção das populações celulares suscetíveis a fatores que induzem mutação e/ou proliferação anormal (MaSCs), pois tais células se encontram diferenciadas em função do aleitamento, conferindo proteção contra a neoplasia (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

2.3.5 Incidência e epidemiologia do câncer de mama contralateral

Mulheres que são diagnosticadas com câncer de mama têm um risco aumentado de desenvolver a neoplasia na mama oposta ou contralateral (McCASKILL-STEVENS *et al.*, 2004). O risco estimado é de duas a seis vezes maior em comparação com o risco de mulheres saudáveis desenvolverem câncer de mama primário para a população em geral (CHEN *et al.*, 1999). Enquanto uma mulher saudável com 55 anos de idade apresenta 2,5% de chance para desenvolver câncer invasivo nos 15 anos subsequentes, aquela sobrevivente à doença, com a mesma idade, tem esse risco aumentado para 10 a 15% (BRENNER, 2010).

Estudos têm descrito que fatores de risco envolvidos com a etiologia de tumores primários de mama também estão associados com o desenvolvimento de tumores mamários contralaterais, tais como a história familiar positiva e mutações em genes de suscetibilidade ao câncer de mama (*BRCA1* e *BRCA2*, por exemplo). Outros fatores podem ser exclusivos para o tumor secundário, como o tempo de diagnóstico do tumor primário, o tipo histológico lobular do mesmo e a radioterapia, aspectos estes que aumentam o risco da neoplasia. Já a quimioterapia e o tratamento com tamoxifeno têm sido associados à redução desse risco (CHEN *et al.*, 1999).

O conhecimento limitado sobre a etiologia dos cânceres de mama secundários é refletido nas abordagens utilizadas na condução destes casos. As estratégias preventivas contra a neoplasia incluem a terapia hormonal adjuvante e a mastectomia contralateral profilática (BRENNER, 2010).

Chen e colaboradores (1999) enfatizam a necessidade de estudos adicionais com potenciais fatores de risco associados com o desenvolvimento de carcinomas contralaterais, com o objetivo de aumentar a incidência e a sobrevida de mulheres acometidas por cânceres primários. Além disso, a compreensão da etiologia de tal neoplasia pode ajudar a identificar pacientes com risco aumentado da mesma, o que, por sua vez, auxilia na determinação de métodos preventivos e protetivos apropriados.

Assim, torna-se importante ampliar o conhecimento sobre o perfil biológico da mama contralateral, sua contraparte adjacente ao tumor e o próprio tecido tumoral, evidenciando possíveis características em comum, com o objetivo de identificar marcadores da doença.

2.4 ABORDAGEM PROTEÔMICA

O advento da proteômica está diretamente relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e seus impactos no metabolismo celular. Segundo HOODERMARCK e colaboradores (2008), a abordagem proteômica se consolida como um método fundamental para elucidar a expressão de novas proteínas, novas modificações pós-traducionais, e novas redes de proteínas que podem ser utilizadas para uma melhor compreensão, detecção e tratamento do câncer.

O termo proteoma se refere ao conjunto de proteínas expresso pelo genoma sob determinadas condições fisiológicas, refletindo o estado atual de funcionamento do sistema (WILKINS *et al.*, 1996). Em contraste com o genoma, o proteoma é dinâmico e está em constante fluxo em função da combinação de diversos fatores, como o *splicing* diferencial de mRNA, as modificações pós-traducionais e a regulação temporal e funcional da expressão gênica (SRINIVAS *et al.*, 2002). Enquanto o genoma humano contém aproximadamente 35 mil genes, a ocorrência dos eventos citados acima pode aumentar a expressão protéica de 500 mil para um

milhão (GALVÃO *et al.*, 2011). Sendo assim, as proteínas podem refletir com maior precisão os mecanismos genéticos intrínsecos de uma célula e seus impactos sobre o microambiente, já que são as efetoras e caracterizam alvos terapêuticos mais acessíveis que os ácidos nucleicos (ANDERSSON *et al.*, 2007).

Estudos de proteoma estão em desenvolvimento para decifrar os mecanismos moleculares do câncer de mama, como crescimento celular e processo metastático, objetivando a compreensão dos mecanismos básicos de iniciação e progressão, além de identificação de novos alvos terapêuticos (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

As aplicações da proteômica incluem a pesquisa por proteínas totais; a caracterização de perfis de expressão protéica, para estudos comparativos entre tecidos tumorais e não tumorais, por exemplo; o mapeamento de conjuntos de proteínas, para determinar interações protéicas; e a caracterização das modificações pós-traducionais (SOMIARI *et al.*, 2005). Outra aplicação importante é a identificação de potenciais biomarcadores, sendo que mutações gênicas, alterações na transcrição e tradução bem como alterações nos produtos protéicos podem ser potencialmente utilizadas (WULFKUHLE *et al.*, 2003).

As análises proteômicas englobam uma série de metodologias de separação de proteínas. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), primeiramente descrita por O'Farrell e Klose em 1975, é o método de referência para a separação, sendo realizada em função de dois parâmetros físico-químicos: a primeira dimensão é baseada no ponto isoelétrico (pI) intrínseco através da focalização isoelétrica (IEF) e na segunda dimensão as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares pela eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). O resultado é um mapa bidimensional das proteínas produzidas por uma célula ou tecido, com *spots* dispersos em que cada um corresponde a uma proteína em particular (ROCHA *et al.*, 2005). A identificação protéica é realizada através de análises por espectrometria de massa (MS), um método que tem por base a determinação da relação massa/carga de íons em fase gasosa. Segundo WULFKUHLE e colaboradores (2003), esta técnica é destinada à identificação de proteínas diferencialmente expressas entre tecidos não tumorais e tumorais em vários cânceres, inclusive no de mama.

Diversos estudos utilizando metodologias proteômicas têm revelado uma grande quantidade de informações referentes ao perfil proteico de tecidos específicos, além de dados sobre a expressão proteica diferencial entre tecidos

tumorais e não tumorais bem como entre diferentes tipos de carcinoma. O câncer de mama tem sido objeto de muitos desses estudos e, aliando métodos de separação e identificação de proteínas a técnicas de validação, muitas proteínas envolvidas na carcinogênese mamária já foram determinadas (WULFKUHLE *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2006; MINAFRA *et al.*, 2006; TOILLON *et al.*, 2007; KAVISKI, 2010; MILIOLI, 2011).

Analisando comparativamente unidades ductais/lobulares e carcinoma ductal *in situ*, Wulfkühle e colaboradores (2002) identificaram proteínas previamente não relacionadas com o câncer de mama, incluindo aquelas regulatórias do tráfico intracelular de membranas, vesículas, agentes preventivos do câncer, além de achados relacionados com arquitetura do citoesqueleto, função chaperona, microambiente, apoptose e instabilidade genômica. A análise proteômica do carcinoma ductal *in situ* também revelou diferenças no padrão de expressão em relação a estudos anteriores baseados em ácidos nucleicos e permitiu a identificação de novas facetas nos estágios iniciais de progressão da neoplasia.

Estudos proteômicos comparando tecidos mamários tumorais e não tumorais adjacentes ao tumor também revelaram importantes proteínas associadas à tumorigênese, sendo super ou subexpressas em relação ao estado não tumoral. Os achados sugerem alterações no suprimento sanguíneo no tumor, através de componentes de proteínas plasmáticas identificadas; vias regulatórias que são controladas por modificações pós-traducionais, como ubiquitinação, indicada pela superexpressão de unidades pertencentes ao sistema ubiquitina-protease; proliferação ativa das células malignas bem como metabolismo de substâncias aumentado, uma vez que proteínas envolvidas na síntese proteica e proteases relacionadas à infiltração tecidual foram determinadas; além de outras informações relacionadas ao câncer (DENG *et al.*, 2006).

Ampliando os dados obtidos por essa abordagem, Minafra e colaboradores (2006) apresentaram um catálogo contendo 162 proteínas identificadas em um protótipo de mapa proteômico de células mamárias tumorais, resultante de estudos prévios. Com base em critérios de afinidade mais próxima de suas principais funções biológicas, foram delineadas classes funcionais para o agrupamento das proteínas, sendo elas: (1) proteínas de citoesqueleto e associadas; (2) enzimas metabólicas; (3) chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*; (4) proteínas associadas à membrana, com múltiplas atividades; (5) proteínas ligantes de cálcio; (6) proteínas

com funções ligantes; (7) biossíntese de proteínas; (8) biossíntese de nucleotídeos; (9) Reguladores do crescimento e proliferação celular; (10) Degradação proteica; (11) Detoxificação e proteínas redox; (12) proteínas com atividade extracelular e (13) fragmentos de proteínas. No entanto, os autores ressaltam que devido ao fato de muitas proteínas serem multifuncionais, a atribuição dentro de um único grupo funcional está sujeita a futuras revisões.

A análise proteômica comparativa entre carcinomas primários de mama e linfonodos axilares correspondentes, realizada por Milioli (2011), revelou proteínas exclusivas ou com expressão aumentada entre ambos os tecidos. Ao todo, 72 proteínas diferentes foram identificadas e, em sua maioria, as funções biológicas destas apresentaram papel relevante na carcinogênese mamária, incluindo proteínas envolvidas em processos de divisão celular, organização do citoesqueleto, diferenciação, proliferação e apoptose.

Estudos comparativos com diferentes subtipos de carcinoma mamário também podem fornecer informações importantes acerca das particularidades de cada doença, as quais podem ser úteis na individualização das intervenções terapêuticas. O estudo de Oliveira (2011) revelou a expressão diferencial de 26 proteínas em amostras de carcinomas mamário ductal e lobular. Tais proteínas estão relacionadas a apoptose, resposta ao estresse, organização do citoesqueleto, diferenciação, proliferação, progressão, angiogênese e regulação da divisão celular, podendo desempenhar um papel importante nas propriedades específicas de cada subtipo tumoral.

Dados de estudos com tecido mamário não tumoral também forneceram informações importantes sobre a biologia da glândula mamária e suas possíveis interações com células tumorais. Toillon e colaboradores (2007) reportaram a interação entre estas através de abordagens proteômicas para purificar e identificar fatores pró-apoptóticos secretados pelas células não tumorais (IGFBP-3 e maspina), com efeitos supressores sobre as células tumorais.

A análise proteômica de tecidos mamários não tumorais adjacentes ao tumor, realizada por Costa e colaboradores (2011), revelou informações da mama em estado normal, cujas proteínas identificadas foram incluídas em classes funcionais propostas pelo catálogo acima descrito; os dados também demonstraram a função das modificações pós-traducionais na biologia da glândula mamária bem como proteínas descritas como diferencialmente expressas em relação ao tumor. Tal fato

sugere a importância da caracterização desse tecido frente aos estudos comparativos, uma vez que muitos dos processos necessários para o desenvolvimento mamário são recapitulados na tumorigênese, especialmente na cascata metastática (COLETTA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar amostras de tecido mamário não tumoral contralateral pelo método proteômico, fornecendo dados para a caracterização do perfil proteico deste tecido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e identificar, por PMF, as proteínas mais frequentes nas amostras de tecido mamário não tumoral contralateral;
- Analisar as proteínas identificadas no contexto de suas funções biológicas.
- Gerar informações sobre o perfil proteico desse tecido para compor o banco de dados de estudos proteômicos realizados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Este estudo foi realizado com quatro amostras de tecido não tumoral, coletado da mama contralateral àquela portadora de carcinoma ductal mamário, durante o ato cirúrgico (QUADRO 1). Foram obtidas nos Hospitais Nossa Senhora das Graças (HNSG) e das Clínicas (HC) de Curitiba, no período de 2010 (uma) 2012 (três). Após a coleta, o material biológico foi encaminhado ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Código	Idade	Tipo Histológico*
CP699 Nct	46	Carcinoma Ductal Invasivo
CP752 Nct	40	Carcinoma Ductal Invasivo
CP753 Nct	39	Carcinoma Ductal Invasivo
CP759 Nct	76	Carcinoma Ductal Invasivo

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

FONTE: O autor (2013)

NOTA: * Tipo histológico do tumor que acometia a mama oposta à qual foi retirada o tecido não tumoral.

Este estudo faz parte de um amplo projeto sobre genética dos tumores mamários, que vem sendo desenvolvido pelo LabCHO e pelo Serviço de Mastologia do Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, PR), e foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG, Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O processamento do material foi realizado no fluxo laminar para a remoção de resquícios de vasos sanguíneos e gordura, descartados posteriormente. As amostras foram dispostas sobre Placas de Petri e fragmentadas com o auxílio de

pinças e tesouras estéreis, sendo estocadas a -80°C para futura extração das proteínas.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para a obtenção dos extratos protéicos foram utilizados cerca de 0,2g de amostra, acrescidos de 700 μL de Tampão de Lise (7M de uréia, 2M de tiouréia, 40mM de tris, 40mM de DTT 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. Esta etapa envolve a solubilização, desnaturação e redução de proteínas que, sob a ação dos reagentes da solução de lise, rompem as interações intra- e intermoleculares, mantendo-as imobilizadas em solução.

Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm x g por 5 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C , resultando em um sobrenadante contendo as proteínas.

A técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), foi utilizada para a mensuração da concentração protéica das amostras. A proteína albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*, BSA) foi utilizada em seis concentrações (1, 2, 3, 4, 5 e 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na confecção da curva-padrão. Para sua utilização, o reagente de Bradford (Sigma) foi diluído 1:5 em água ultra pura. A partir da concentração obtida, foi determinado o volume de extrato protéico aplicado nas tiras de IPG (*immobilized pH gel*).

4.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

4.4.1 Primeira dimensão – Isoeletrofocalização (IEF)

A focalização isoelétrica foi realizada para separar as proteínas em função de seus pontos isoelétricos (pI), sendo este o valor de pH no qual a soma de todas as cargas parciais da proteína é igual a zero (carga total nula).

Foram utilizadas tiras de IPG (*immobilized pH gel*) na faixa de pH de 4-7 (130x3x0,5 mm; GE Healthcare). Para a reidratação foi utilizado um suporte de acrílico com 12 canaletas (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray/ Amersham Biosciences*), no qual 1000µg de amostra foram aplicadas em solução de reidratação contendo 7M de uréia, 2M de tiuréia, 2% de CHAPS, 0,5% de IPG, 50mM de DTT e traços de azul de bromofenol (adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* – GE Healthcare, 2004). Em seguida, as tiras foram colocadas com a superfície do gel voltada para baixo e cobertas com 2ml de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid/ GE Healthcare*), evitando que a uréia se cristalice e as tiras sequem, limitando também o risco de contaminação das amostras. O período de reidratação para todas as tiras foi de 18 horas, em temperatura ambiente.

Após a reidratação, as tiras de IPG foram transferidas para uma placa de cerâmica com 12 canaletas (*Manifold/ Amersham Bioscience*), com a superfície do gel voltada para cima, e acrescentou-se *DryStrip Cover Fluid*. Esta etapa foi realizada no *Ettan IPGphor II* (Amersham Bioscience), com o programa específico para a tira de 13 cm, pH 4-7 (QUADRO 2). Após a IEF as tiras foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

Fase	Voltagem (V)	Tempo	kV/h
1	500	1:00h	0,5
2	1000	1:00h	0,8
3	8000	2:30h	11,3
4	8000	0:30h	4,1
Total	-	5:00h	16,7

QUADRO 2 – PROGRAMA PARA O ETTAN IPGPHOR II (TIRA DE 13CM; PH 4-7)
 FONTE: GE HEALTHCARE HANDBOOK, 2-D Electrophoresis *Principles and Methods* (2004)

4.4.2 Segunda Dimensão

4.4.2.1 Equilíbrio das Tiras de IPG

As tiras de IPG foram equilibradas em duas etapas de 30 minutos cada, antes de correr a segunda dimensão. O primeiro equilíbrio foi realizado com 5ml de

tampão de equilíbrio (50mM de Tris-HCl – pH 8,8, 6M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS e traços de azul de bromofenol) acrescido de 100mg de DTT (agente redutor), adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). No segundo, foram adicionados 5ml de tampão de equilíbrio e 400mg de iodacetamida, prevenindo a reoxidação das proteínas durante a eletroforese, o que poderia resultar em traços e artefatos no gel.

4.4.2.2 Preparação do Gel 2D e Corrida Eletroforética (2D-PAGE)

Para a corrida 2D foi utilizado um gel de poli-acrilamida a 10% com dimensões de 18 cm x 16 cm (água ultra-pura, 30% de mix de acrilamida/ bis-acrilamida, 1,5M Tris – pH 8,8, 10% de SDS, 10% de persulfato de amônio e 0,04% de TEMED) num volume final de 40ml.

As tiras de IPG foram posicionadas horizontalmente sobre o gel SDS-PAGE 10%, com adição de agarose (0,5%) para selar a tira. A corrida 2D foi realizada na cuba de eletroforese *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare) sob temperatura ajustada (11°C) e com o programa para corrida de 15mA/ gel nos 30 minutos iniciais e o restante da corrida a 30mA/ gel. A corrida foi interrompida quando a linha de migração atingiu 1 cm do limite inferior do gel 2D.

Nesta etapa as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular e o resultado final consiste em um gel com diversos *spots* dispersos, que correspondem a proteínas particulares.

4.5 FIXAÇÃO DAS PROTEÍNAS E COLORAÇÃO DO GEL 2D

Após a corrida, o gel 2D foi fixado em solução contendo 1,3% de ácido ortofosfórico (85%) e 20% de metanol por uma hora.

A coloração dos géis foi efetuada com Coomassie coloidal (G-250) por 18 horas e a descoloração com água destilada até que a marcação dos *spots* ficasse nítida e o gel claro.

4.6 DIGITALIZAÇÃO DO GEL 2D E ANÁLISE DAS IMAGENS

A digitalização dos géis 2D foi realizada pelo equipamento *ImageScanner™ II* (Amersham Bioscience/ GE Healthcare) e a análise das imagens pelo software *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (Amersham Bioscience/ GE Healthcare). Os parâmetros definidos para a detecção dos *spots* no programa foram os seguintes: *min area* = 10 (reduz artefatos, como partículas do gel com *pixels* muito escuros); *smooth* = 3 (define a resolução e discrimina ruídos dos *spots* sobrepostos, otimizando a detecção de *spots* reais); e *saliency* = 15 (determina a curvatura do *spot*, atua como um filtro para que os *spots* selecionados sejam ajustados de forma a apresentar saliência maior que a de fundo).

Foram selecionados dois *spots* correspondentes de referência, denominados *landmarks*, para o pareamento (*matching*) entre as replicatas da mesma amostra e entre os géis de referência para a análise comparativa. Após a detecção e o pareamento automáticos, os *spots* foram revisados manualmente a fim de verificar eventuais marcações incorretas.

O programa utiliza como parâmetro para a análise estatística o volume relativo dos *spots*. A normalização do volume dos pontos protéicos detectados considera o volume total dos mesmos, no qual o volume de cada ponto é dividido pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100.

Como *spots* de interesse para serem submetidos à identificação, foram selecionados aqueles que estavam presentes em até duas das quatro amostras utilizadas no estudo.

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).

4.8 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL 2D

4.8.1 Excisão e Digestão dos *spots* de interesse

Os *spots* de interesse foram manualmente removidos do gel com o auxílio de ponteiras novas estéreis (para 1000µL) e descorados em 400µL de solução 50%

acetonitrila e 25mM bicarbonato de amônio, por uma hora. O procedimento foi repetido duas vezes ou até a completa descoloração.

Em seguida, os *spots* foram submetidos a duas etapas de desidratação em 200µL de acetonitrila 100%, por 5 minutos cada. A acetonitrila foi descartada e os fragmentos de gel ficaram secando a temperatura ambiente, por cerca de uma hora.

Para a digestão proteolítica, os *spots* foram reidratados em 20µL de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin* – Promega) – 15ng/L 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 18 a 20 horas. Após, a concentração dos peptídeos foi realizada em duas etapas de extração dos peptídeos com solução 5% TFA : 50% acetonitrila sob agitação, com posterior centrifugação à vácuo. Quando necessário, os peptídeos foram ressuspensos em 4µL de TFA 0,1%.

A solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução 50% acetonitrila: 0,1% ácido trifluoracético (TFA), saturada com matriz de HCCA (ácido α -iano-4-hidroxicinamínico). O volume final de 1µL foi aplicado em placa para MALDI (*scout MTP MALDI ion source 384 target* - Bruker Daltonics).

4.8.2 Análise dos espectros de massas

As massas dos peptídeos tripticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). Tal técnica é baseada na desorção e ionização das proteínas com laser, auxiliado por uma matriz (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) que avalia o conteúdo através do tempo de vôo dos íons no tubo de análise (TOF – *Time Of Flight*).

Os dados da fragmentação de peptídeos foram obtidos através do programa *FlexControl 3.0* (Bruker Daltonics). 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 calibrador interno foram utilizados picos gerados pela 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).

4.8.3 Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas a partir do padrão de massas obtido (PMF – *peptide mass fingerprinting*), utilizando a plataforma MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) associada 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 (ANEXO 1). A tolerância de erro máxima foi de 100 a 200 ppm (partes por milhão).

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. Para a busca por proteínas humanas, utilizando o banco de dados *Swiss-Prot* e a plataforma MASCOT, esse valor é 56. Quanto maior o *score*, maior a confiabilidade na identificação;

- **Percentual da cobertura de sequência:** este valor indica o quanto da sequência de aminoácidos da proteína sugerida foi coberto pelos peptídeos resultantes da digestão tríptica da amostra. Foram considerados satisfatórios valores acima de 20%;

- **Número de peptídeos sobrepostos:** corresponde aos picos de massa obtidos por espectrometria de massa (MS) e que foram pareados com as massas teóricas, contidas no banco de dados da plataforma. A quantidade mínima de massas peptídicas pareadas considerada satisfatória foi 4.

- **Dados de MM e pI esperados:** valores teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico.

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

5 RESULTADOS

5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os valores das concentrações protéicas de cada amostra, e a quantidade de material utilizado para a obtenção dos extratos estão descritos no QUADRO 3.

Amostra Tecido não tumoral contralateral	Quantidade utilizada (g)	Concentração proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
CP699 Nct	0,21	9,51
CP752 Nct	0,21	13,06
CP753 Nct	0,21	9,01
CP759 Nct	0,21	8,19

QUADRO 3 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS

5.2 CONFECÇÃO E ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

Os géis foram confeccionados com 1000 μg de proteínas. Mesmo com o ajuste nos procedimentos de extração, a amostra CP759 Nct apresentou baixa concentração proteica e o volume de extrato disponível permitiu a confecção de apenas dois géis. Para a amostra CP699 Nct, dois géis foram analisados em decorrência da focalização parcial de uma das tiras de IPG, o que comprometeu a separação das proteínas em função do *pI* e inviabilizou sua inclusão no estudo.

Ao todo, dez géis foram analisados neste estudo através do programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare), conforme já descrito em Material e Métodos.

Os valores médios de *spots* para cada amostra foram: CP699 Nct – 578,33; CP752 Nct – 1223; CP753 Nct – 605,33; e CP759 Nct – 824. O número de *spots* detectado em cada replicata está descrito no QUADRO 4.

Amostra Tecido não tumoral contralateral	Gel 2D	Nº de spots detectados
CP699 Nct	1	597
	2*	669
CP752 Nct	1	996
	2*	952
	3	475
CP753 Nct	1	511
	2*	611
	3	482
CP759 Nct	1	279
	2*	319

QUADRO 4 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS
 LEGENDA: 1, 2 e 3 - géis em triplicatas; * - gel referência.

Após o *matching* entre as replicatas de cada amostra, foi determinado um gel de referência para cada uma, baseado na representatividade e resolução dos *spots* (FIGURA 9).

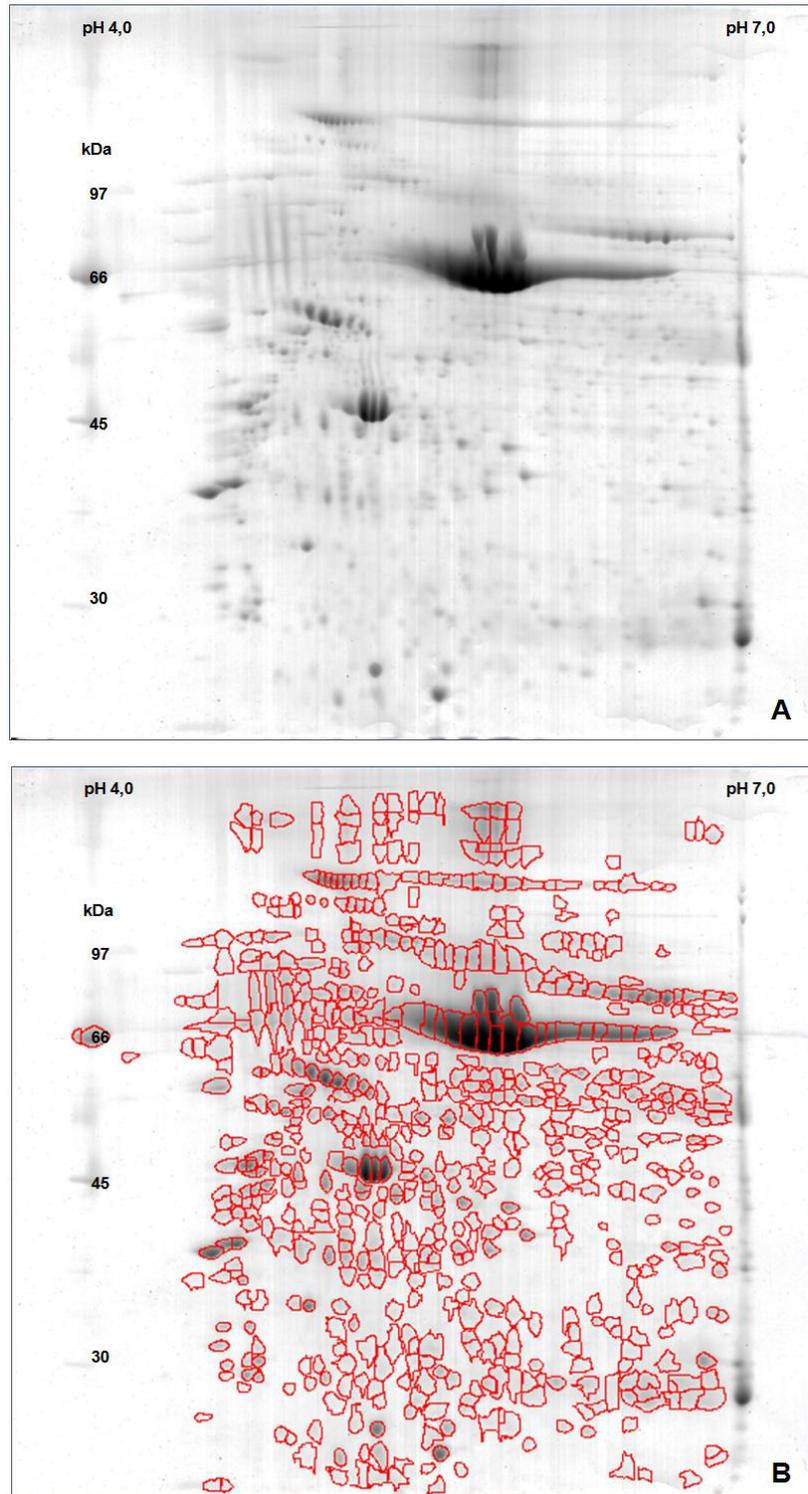


FIGURA 9 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continua)

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: A – Imagem da amostra CP699 Nct2 capturada com ajuste de contraste; B – Imagem da amostra CP699 Nct2 após detecção dos spots (destacados em vermelho) pelo programa *ImageMaster[™] 2D Platinum v6.0* e plotagem de MM e pl.

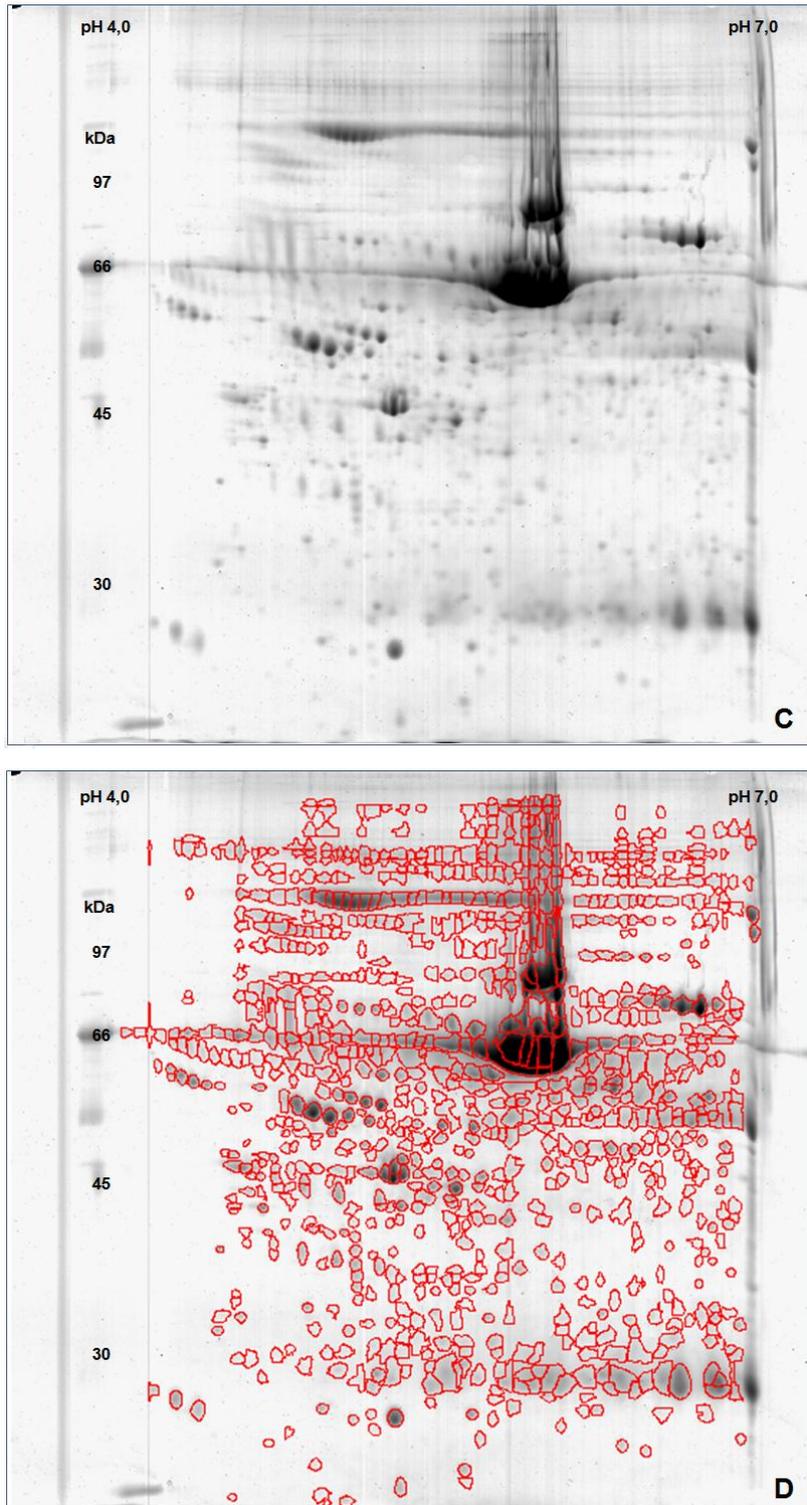


FIGURA 9 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continuação)

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: **C** – Imagem da amostra CP752 Nct2 capturada com ajuste de contraste; **D** – Imagem da amostra CP752 Nct2 após detecção dos spots (destacados em vermelho) pelo programa *ImageMaster[™] 2D Platinum v6.0* e plotagem de MM e pl.

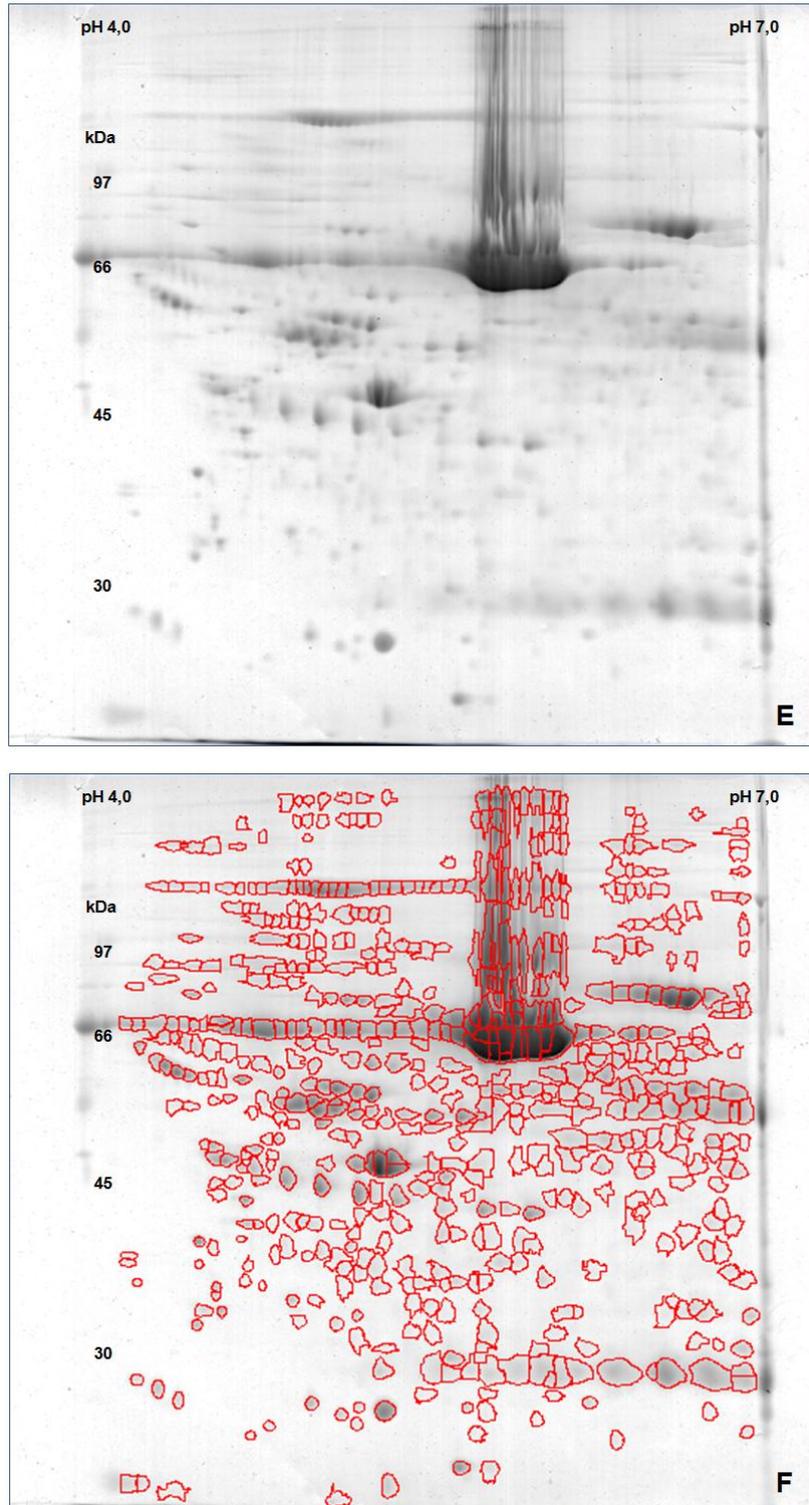


FIGURA 9 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continuação)

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: **E** – Imagem da amostra CP753 Nct2 capturada com ajuste de contraste; **F** – Imagem da amostra CP753 Nct2 após detecção dos spots (destacados em vermelho) pelo programa *ImageMaster^{2D} Platinum v6.0* e plotagem de MM e pl.

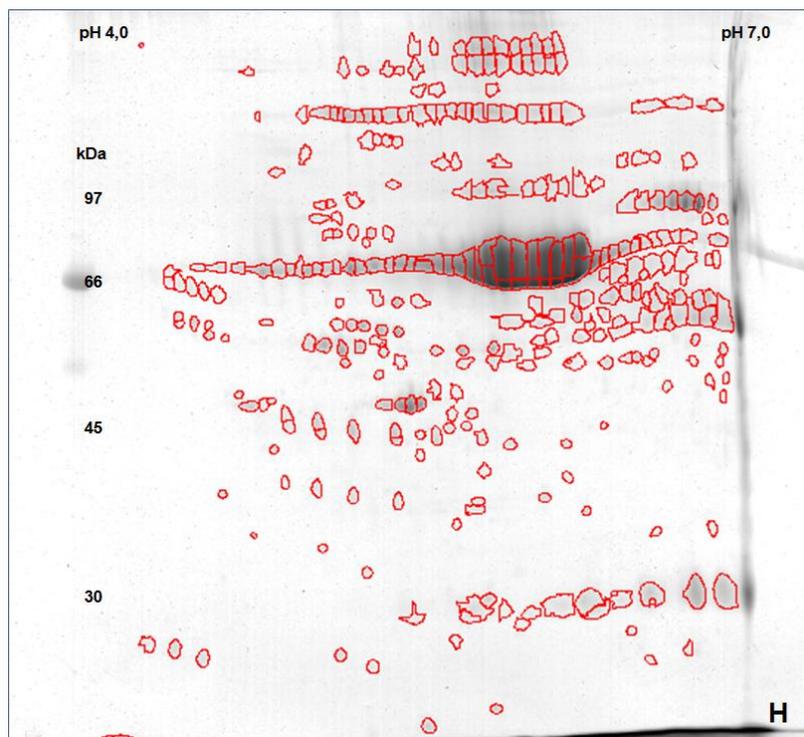
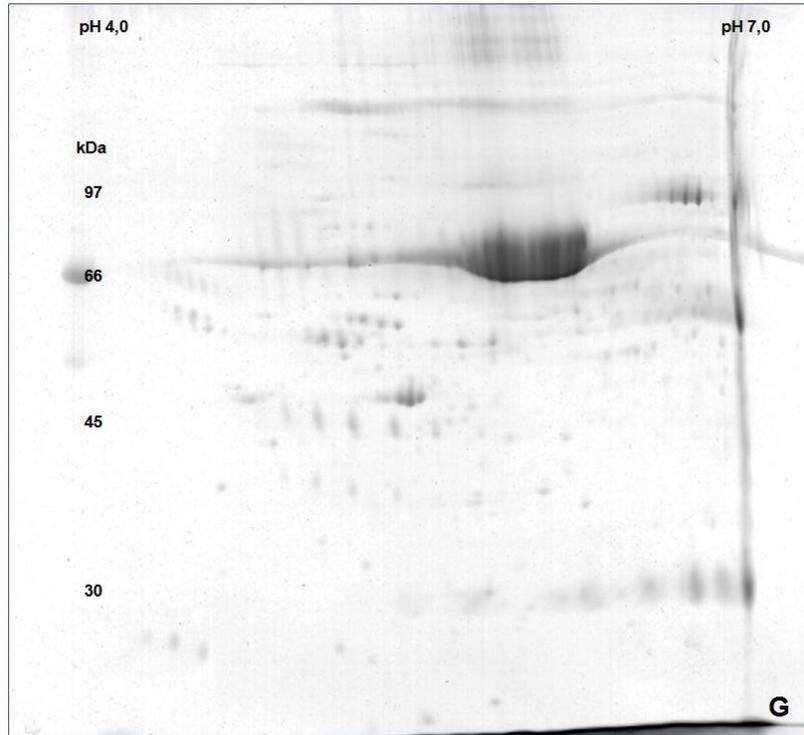


FIGURA 9 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continuação)

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: **G** – Imagem da amostra CP759 Nct2 capturada com ajuste de contraste; **H** – Imagem da amostra CP759 Nct2 após detecção dos spots (destacados em vermelho) pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* e plotagem de MM e pl.

Em seguida, os géis de referência de cada amostra foram submetidos à análise comparativa intraclasse, que avalia mudanças na expressão de proteínas dentro de uma mesma classe de géis. O gel CP752 Nct2 foi determinado como *master* da população (classe), servindo como base para calcular, através do programa, o pI e MM experimental para todas as proteínas identificadas.

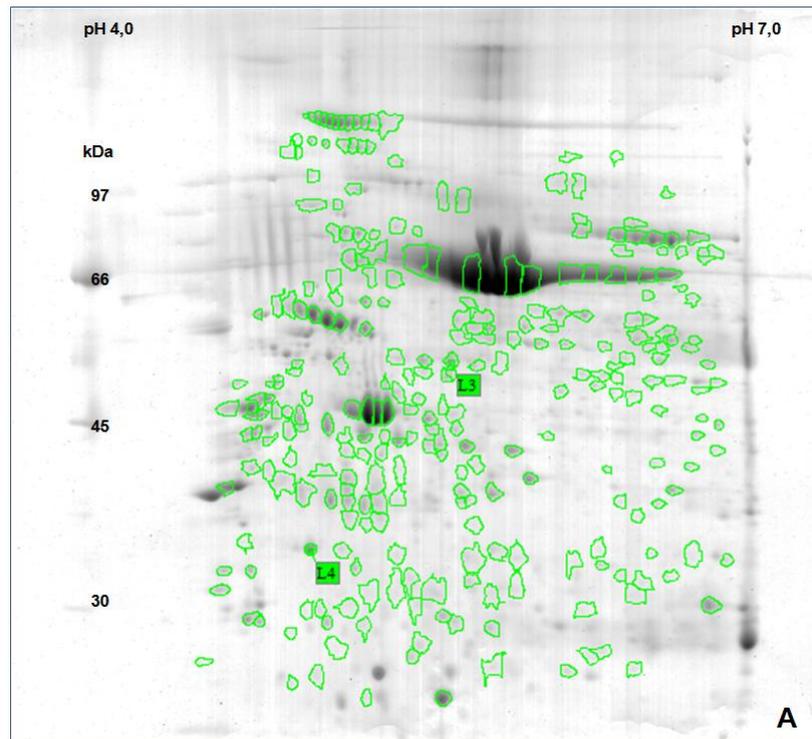


FIGURA 10 – ANÁLISE DOS GEIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continua)

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os *spots* correspondentes (*matches*) entre os quatro géis de referência estão destacados em verde. *Landmarks* (L3 e L4) utilizados no *matching* entre as amostras estão destacados pelos quadrados verdes.

LEGENDA: A – CP699 Nct2.

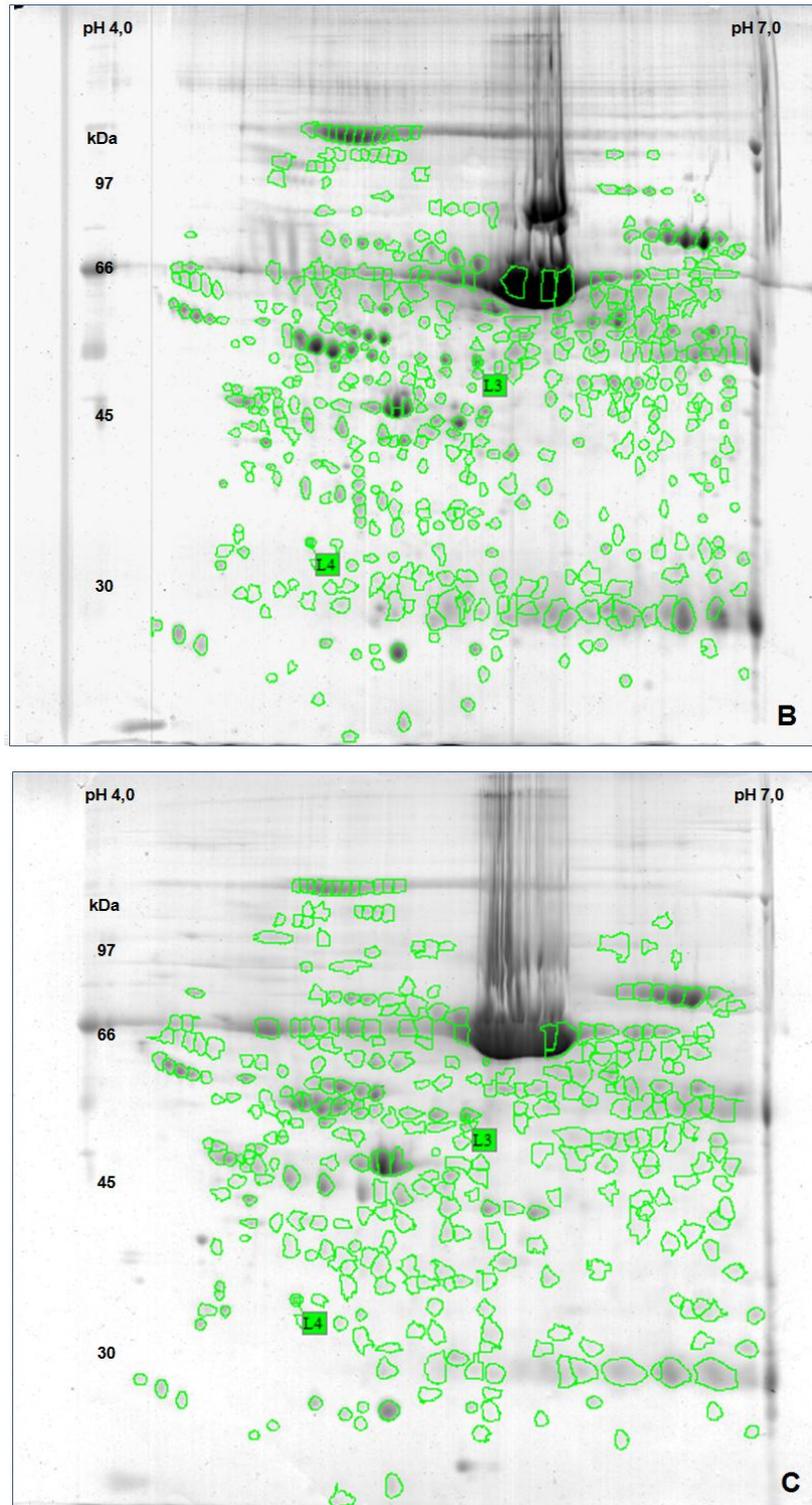


FIGURA 10 – ANÁLISE DOS GEIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continuação)

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os *spots* correspondentes (*matches*) entre os quatro géis de referência estão destacados em verde. *Landmarks* (L3 e L4) utilizados no *matching* entre as amostras estão destacados pelos quadrados verdes.

LEGENDA: **B** – CP752 Nct2 (*master*); **C** – CP753 Nct2; **D** – CP759 Nct2.

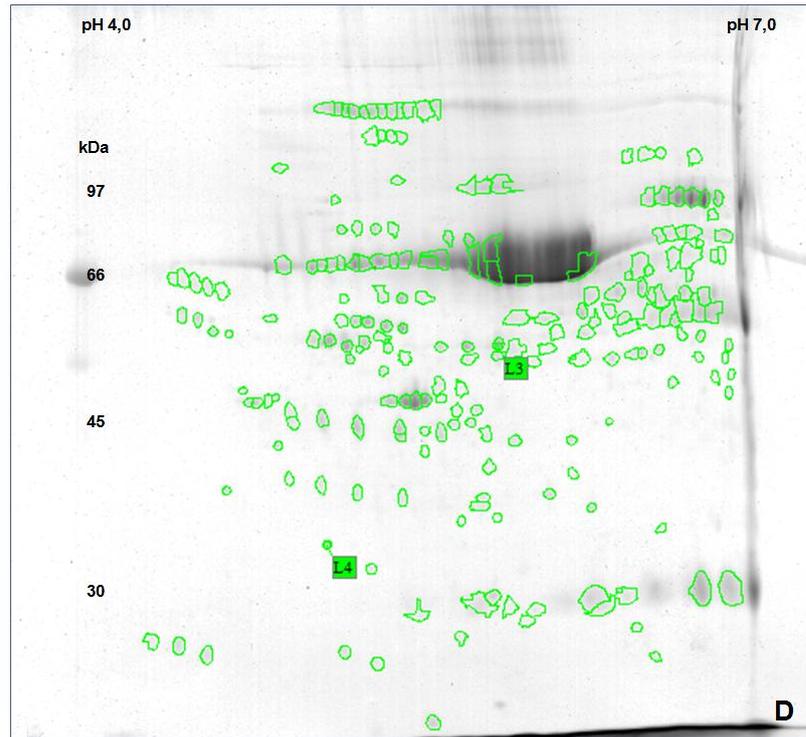


FIGURA 10 – ANÁLISE DOS GEIS BIDIMENSIONAIS DE REFERÊNCIA (continuação)

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os *spots* correspondentes (*matches*) entre os quatro géis de referência estão destacados em verde. *Landmarks* (L3 e L4) utilizados no *matching* entre as amostras estão destacados pelos quadrados verdes.

LEGENDA: D – CP759 Nct2.

Com essa análise foi possível verificar que 439 *spots* estavam presentes no gel *master* e em pelo menos metade das amostras utilizadas no estudo, sendo que 99 (22,5%) apresentavam-se em todas as amostras, 172 (39,2%) em três e 168 (38,3%) em duas delas.

Dentre os 439 *spots*, 80 de interesse foram estabelecidos, com base na coloração e resolução que apresentavam nos géis bidimensionais. Destes, 29 (36,3%) estavam presentes em todas as amostras, 35 (43,7%) em três e 16 (20%) em duas delas. Todos esses *spots* foram submetidos aos procedimentos para identificação das proteínas.

5.3 IDENTIFICAÇÃO PROTEICA

Inicialmente, devido à baixa concentração de fragmentos peptídicos, não foram obtidos espectros de massa que permitissem a identificação de proteínas junto ao banco de dados, pois o *score* e/ou o percentual de cobertura de sequência obtidos apresentavam-se abaixo do estabelecido para a identificação válida.

Após a concentração dos peptídeos de cada *spot*, foi possível obter resultados satisfatórios na MS. A figura 11 apresenta dois exemplos que ilustram as diferenças de espectros de massa obtidos para *spots* antes e depois do procedimento de concentração.

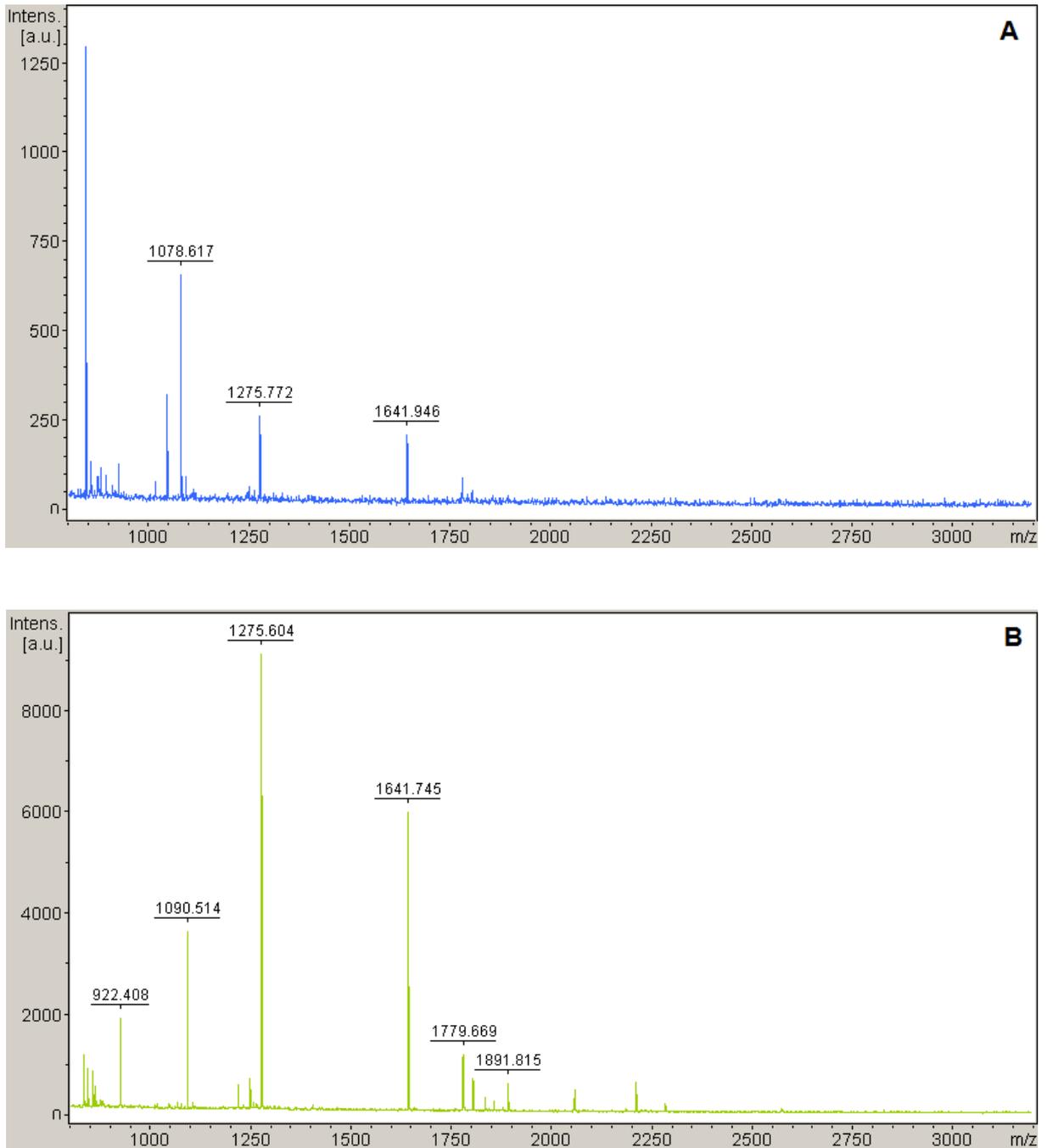


FIGURA 11 – ESPECTROS DE MASSAS (continua)

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: **A** – Espectro de massas do *spot* 853 que não resultou em identificação;

B – espectro de massas obtido para o mesmo *spot* após concentração dos peptídeos e que possibilitou a identificação proteica;

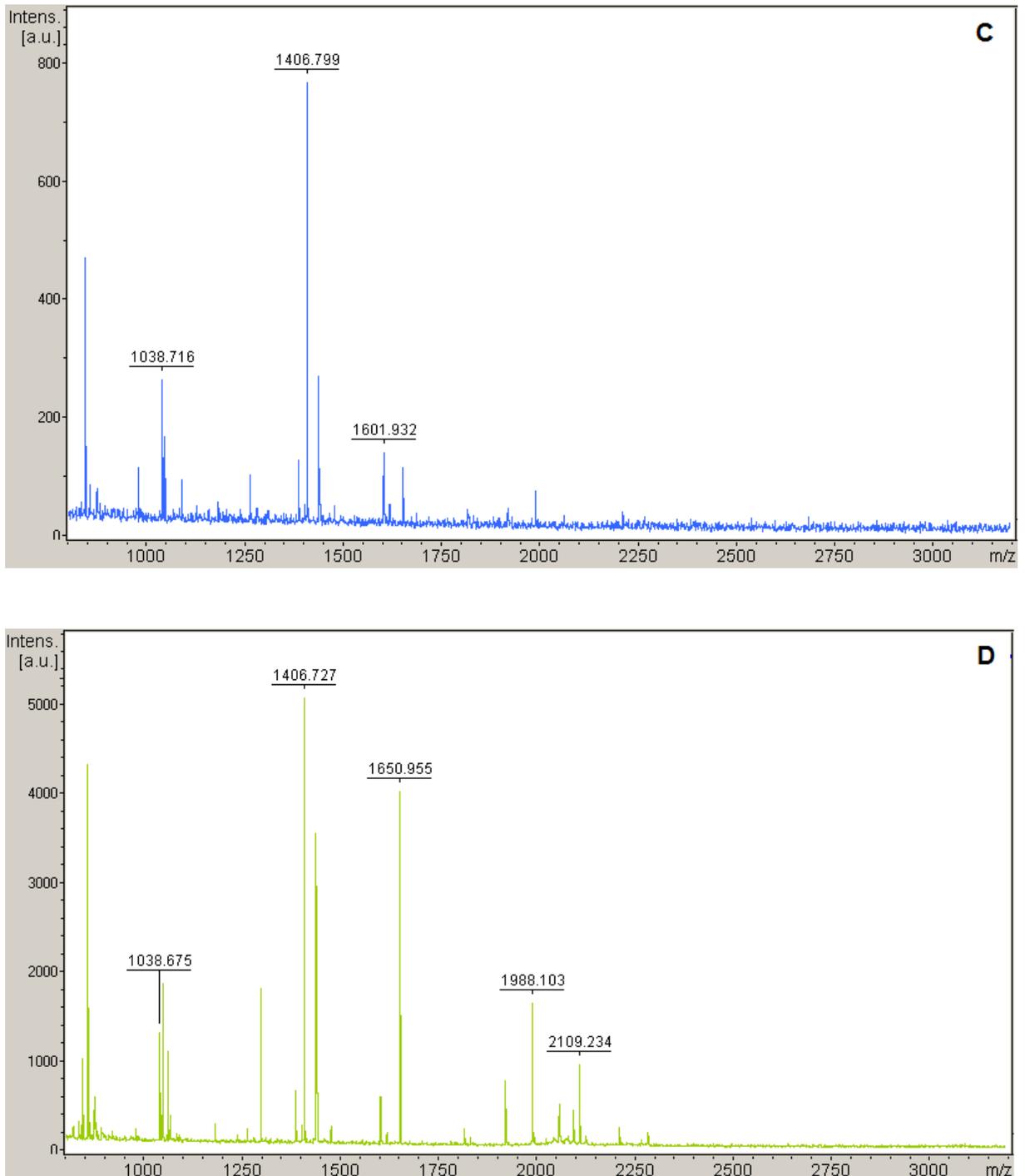


FIGURA 11 – ESPECTROS DE MASSAS (continuação)

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: **C** – Espectro de massas do *spot* 893 que não resultou em identificação; **D** – espectro de massas obtido após concentração dos peptídeos, permitindo a identificação.

Essa metodologia permitiu a identificação positiva para vários *spots*. Aqueles que não revelaram espectros de massa suficientes para a identificação foram novamente excisados dos géis e submetidos à MS. Ao todo, dos 80 *spots* analisados no espectrofotômetro de massas, 48 (60%) obtiveram identificação

positiva e nestes observou-se 36 proteínas diferentes. A figura 12 apresenta o gel *master* com os *spots* identificados em destaque e os dados referentes aos critérios para a identificação das proteínas estão descritos na tabela 1.

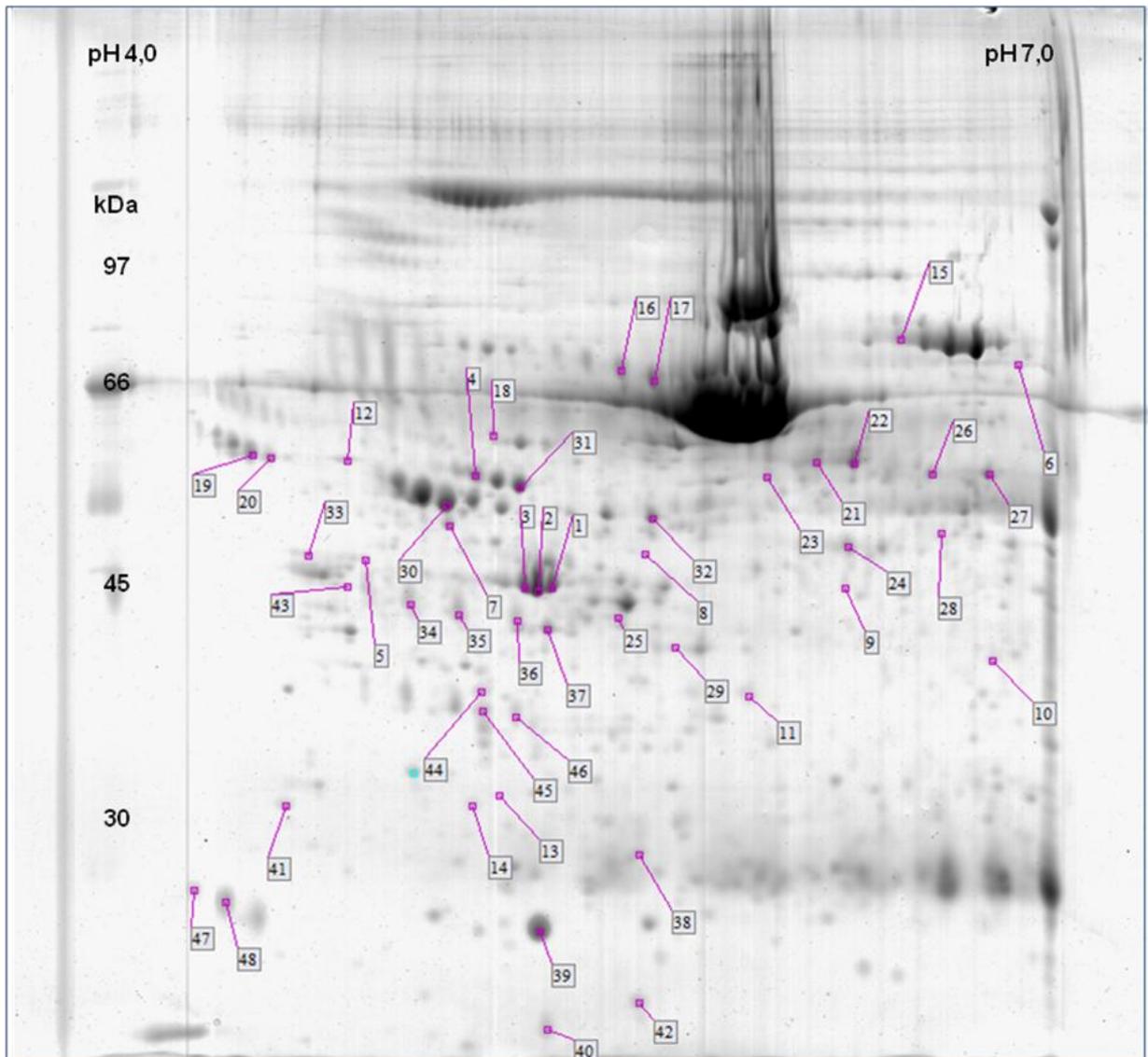


FIGURA 12 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL 2D MASTER
FONTE: O autor (2013)

TABELA 1– PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO

Proteína (SIGLA)	Identificação no gel	Código UniprotKB	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	Δ MM/ Δ pI	Cobertura de sequência	Nº/ peptídeos sobrepostos
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS								
Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	1	P60709 P63261	88/ 37	42,052/ 5,29 42,108/ 5,31	45,000/ 5,28	7,01% / 0,01 6,87% / 0,03	25%	08/ 36
	2	P60709 P63261	69/ 43	42,052/ 5,29 42,108/ 5,31	45,000/ 5,22	7,01% / 0,07 6,87% / 0,09	21%	07/ 24
Actina do músculo liso gama-entérica (ACTH) Actina do músculo liso aórtica (ACTA)	3	P63267 P62736	107/ 29	42,249/ 5,31 42,381/ 5,23	45,000/ 5,18	6,51% / 0,13 6,18% / 0,05	38%	10/ 40
Tubulina cadeia alfa-1A (TUBA1A) Tubulina cadeia alfa-1B (TUBA1B) Tubulina cadeia alfa-1C (TUBA1C)	4	Q71U36 P68363 Q9BQE3	59/ 43	50,788/ 4,94 50,804/ 4,94 50,548/ 4,96	55,000/ 5,01	8,29% / 0,07 8,26% / 0,07 8,81% / 0,05	11%	05/ 10
Vimentina (VIME)	5	P08670	239/ 33	53,676/ 5,06	48,000/ 4,63	10,57% / 0,43	50%	25/ 41
Queratina do citoesqueleto tipo I - 14 (CK14)	6	P02533	71/ 48	51,872/ 5,09	69,000/ 6,90	33,02% / 1,81	18%	11/ 44
ENZIMAS METABÓLICAS								
Subunidade beta da ATP sintetase mitocondrial (ATPB)	7	P06576	133/ 31	56,525/ 5,26	51,000/ 4,91	9,77% / 0,35	25%	10/ 16
Subunidade 1 do complexo citocromo bc1 mitocondrial (QCR1)	8	P31930	102/ 31	53,297/5,94	48,000/5,60	9,94% / 0,34	23%	12/ 26
Adenosilhomocisteinase (SAHH)	9	P23526	78/ 23	48,255/ 5,92	46,000/ 6,29	4,67% / 0,37	16%	08/ 22
Álcool desidrogenase NADP+ (AK1A1)	10	P14550	61/ 43	36,892/ 6,32	40,000/ 6,81	8,42% / 0,49	12%	04/ 05
Glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática NAD+ (GPDA)	11	P21695	208/ 33	38,171/ 5,81	37,000/ 5,15	3,07% / 0,66	56%	19/ 37

CHAPERONAS MOLECULARES

Proteína dissulfeto-isomerase (PDIA1)	12	P07237	84/ 43	57,480/ 4,76	57,000/ 4,56	0,83% / 0,2	11%	06/ 07
PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MEMBRANA COM MÚLTIPLAS ATIVIDADES								
Proteína de canal de cloreto intracelular tipo I (CLIC1)	13	O00299	74/ 26	27,248/ 5,09	32,000/ 5,09	17,44% / 0	19%	05/ 08
	14	O00299	67/ 24	27,248/ 5,09	31,000/ 5,00	13,77% / 0,09	27%	06/ 30
PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO/ TRANSPORTE								
Sorotransferrina (TRFE)	15	P02787	207/ 54	79,294/ 6,81	77,000/ 6,49	2,89% / 0,32	21%	15/ 16
Hemopexina (HEMO)	16	P02790	80/ 32	52,385/ 6,55	68,000/ 5,51	29,81% / 1,04	18%	06/ 08
	17	P02790	72/ 24	52,385/ 6,55	66,000/ 5,63	25,99% / 0,92	18%	10/ 35
Antitrombina III (ANT3)	18	P01008	114/ 27	53,025/ 6,32	59,000/ 5,08	11, 27% / 1,24	23%	15/ 33
Glicoproteína alfa 2-HS (FETUA)	19	P02765	64/ 33	40,098/ 5,43	58,000/ 4,22	44,65% / 1,21	15%	06/ 10
	20	P02765	58/ 23	40,098/ 5,43	57,000/ 4,29	42,15% / 0,94	15%	07/ 19
Soro albumina (ALBU) – Isoforma 2*	21	P02768	59/ 34	47,360/ 5,97	57,000/ 6,19	20,35% / 0,22	9%	05/ 07
	22	P02768	57/ 19	47,360/ 5,97	57,000/ 6,32	20,35% / 0,35	11%	08/ 30
	23	P02768	162/ 30	47,360/ 5,97	56,000/ 6,02	18,24% / 0,05	25%	17/ 31

	24	P02768	62/ 23	47,360/ 5,97	49,000/ 6,29	3,46% / 0,32	14%	06/ 14
	25	P02768	60/ 35	47,360/ 5,97	43,000/ 5,51	9,21% / 0,46	7%	04/ 04
Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB)	26	P02675	142/ 32	56,577/ 8,54	56,000/ 6,60	1,02% / 1,94	36%	19/ 36
	27	P02675	131/ 28	56,577/ 8,54	56,000/ 6,80	1,02% / 1,74	33%	13/ 28
	28	P02675	93/ 27	56,577/ 8,54	50,000/ 6,63	11,62% / 1,91	22%	09/ 18
	29	P02675	76/ 28	56,577/ 8,54	41,000/ 5,70	27,53% / 2,84	18%	07/ 13
Alfa-1- antitripsina (A1AT)	30	P01009	152/ 31	46,878/ 5,37	52,000/ 4,90	10,93% / 0,47	29%	10/ 14
Proteína de ligação à vitamina D (VTDB)	31	P02774	58/ 25	54.526/ 5.40	54,000/ 5,16	0,96% / 0,24	12%	05/ 10
Cadeia gama do fibrinogênio (FIBG)	32	P02679	88/ 31	52,106/ 5,37	52,000/ 5,62	020% / 0,25	18%	07/ 11
Inibidor de ribonuclease (RINI)	33	P13489	167/ 40	51,766/ 4,71	48,000/ 4,43	7,27% / 0,28	39%	12/ 15
Haptoglobina (HPT)	34	P00738	104/ 30	45,861/ 6,13	44,000/ 4,78	4,06% / 1,35	22%	09/ 18
	35	P00738	100/ 39	45,861/ 6,13	44,000/ 4,95	4,06% / 1,18	13%	06/ 06
	36	P00738	120/ 43	45,861/ 6,13	43,000/ 5,15	6,24% / 0,98	21%	08/ 12
	37	P00738	115/ 42	45,861/ 6,13	42,000/ 5,26	8,42% / 0,87	21%	08/ 11
Componente amilóide P do soro (SAMP)	38	P02743	89/ 43	25,485/ 6,10	29,000/ 5,57	13,79% / 0,53	23%	05/ 06

Apolipoproteína A-I (APOA1)	39	P02647	149/ 35	30,759/ 5,56	26,000/ 5,22	15,47% / 0,34	45%	18/ 43
Proteína ligadora de retinol 4 (RET4)	40	P02753	72/ 32	23,337/ 5,76	22,000/ 5,26	5,73% / 0,5	30%	04/ 05
CRESCIMENTO CELULAR E REGULADORES DA PROLIFERAÇÃO								
Proteína 14-3-3 épsilon (1433E)	41	P62258	78/ 40	29,326/ 4,63	31,000/ 4,34	5,71% / 0,29	30%	08/ 13
DETOXIFICAÇÃO E PROTEÍNAS REDOX								
Peroxiredoxina-2 (PRDX2)	42	P32119	78/ 33	22,049/ 5,66	23,000/ 5,57	4,31% / 0,09	26%	05/ 08
BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS								
Proteína ribossomal 40S (RSSA)	43	P08865	82/ 34	32,947/ 4,79	45,000/ 4,56	36,58% / 0,23	29%	05/ 07
OUTRAS FUNÇÕES								
Mimecan (MIME)	44	P20774	58/ 28	34,243/ 5,46	38,000/ 5,04	10,97% / 0,42	13%	05/ 12
	45	P20774	105/ 38	34,243/ 5,46	37,000/ 5,03	8,05% / 0,43	26%	07/ 10
Glicoproteína 4 associada à microfibrila (MFAP4)	46	P55083	76/ 44	28,972/ 5,38	36,000/ 5,15	24,26% / 0,23	15%	04/ 04
Cadeia J da imunoglobulina (IGJ)	47	P01591	58/ 22	18,543/ 5,12	27,000/ 4,03	45,61% / 1,09	28%	04/ 10
	48	P01591	64/ 25	18,543/ 5,12	27,000/ 4,14	45,61% / 0,98	28%	04/ 06

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: **MM** – Massa molecular; **pl** – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pl conforme o banco de dados ExPASy.

De acordo com as informações obtidas nos bancos de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* e NCBI e, conforme o estudo de Minafra e colaboradores (2006), as proteínas identificadas no presente estudo foram classificadas nas seguintes categorias funcionais: (1) citoesqueleto e proteínas associadas; (2) enzimas metabólicas; (3) chaperonas moleculares; (4) proteínas associadas à membrana, com múltiplas atividades; (5) proteínas com funções de ligação/ transporte; (6) reguladores do crescimento e proliferação celular; (7) detoxificação e proteínas redox; (8) biossíntese de proteínas; e (9) outras funções (GRÁFICO 1).

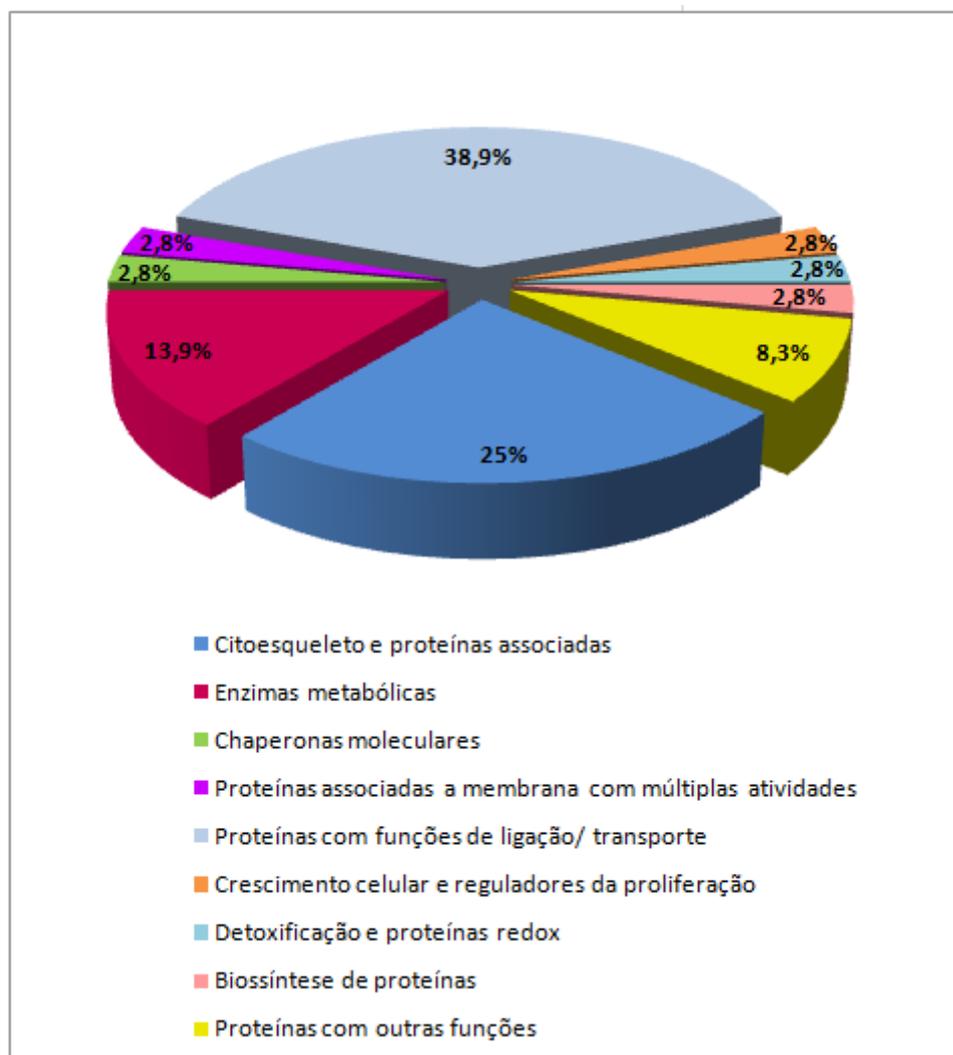


GRÁFICO 1 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS
 FONTE: O autor (2013)

NOTA: As 36 proteínas identificadas foram classificadas de acordo com a função biológica em 9 categorias, com base em Minafra e colaboradores (2006) e bancos de dados do NCBI e *UniProtKB/Swiss-Prot*.

6 DISCUSSÃO

6.1 METODOLOGIA PROTEÔMICA

A metodologia da eletroforese bidimensional requer o preparo adequado da amostra, objetivando uma alta reprodutibilidade, boa resolução e um grande número de *spots* no gel bidimensional. A etapa inicial de extração das proteínas é fundamental nesta abordagem, pois determina os passos subsequentes da análise, principalmente, em relação à confecção dos géis 2D.

Em função da quantidade limitada de material biológico disponível em cada amostra, o protocolo para a extração das proteínas foi alterado para se ajustar a valores próximos a 200mg, ao invés de 400mg previamente padronizados. Para algumas amostras todo o material foi utilizado, maximizando o conteúdo protéico do extrato. Para aproximadamente 200mg de amostra, foi estabelecido como ideal o volume de 700 μ L de Tampão de Lise, uma vez que os 1.000 μ L padronizados poderiam resultar em extratos pouco concentrados e a metade desse volume não forneceria a quantidade de sobrenadante necessária para produzir triplicatas das amostras.

A escolha da faixa de pH utilizada no presente estudo opta por avaliar o maior número de proteínas possível dentro do espectro de pH de 4-7, permitindo uma separação mais nítida das proteínas, em termos de resolução dos *spots*; no entanto, deve-se ressaltar que uma parcela da amostra não foi representada no gel devido a estreita cobertura da faixa de pH. Além disso, proteínas que não compreendem este intervalo podem ficar acumuladas nas extremidades laterais do gel como rastros verticais que dificultam a detecção de eventuais *spots* nessas áreas. Outro aspecto que motivou a utilização dessa faixa de pH foi a possibilidade de comparações futuras com os demais géis bidimensionais já confeccionados em estudos anteriores desenvolvidos no LabCHO, os quais compreendem tal intervalo de pH.

6.2 ANÁLISE PROTEÔMICA EM TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL

Métodos proteômicos têm sido amplamente utilizados na investigação de perfis de expressão gênica de diversos tipos celulares e, mais especificamente na área clínica, os esforços são direcionados para a identificação de proteínas envolvidas no processo patológico, como o câncer, com o objetivo de analisar modificações e interações proteicas relacionadas à progressão da doença bem como potenciais alvos para intervenção terapêutica.

Além de estudos com tecidos tumorais, é importante determinar os padrões de expressão característicos de tecidos não tumorais, uma vez que estes permitem inferir sobre o estado não patológico do mesmo, ampliando o conhecimento acerca do desenvolvimento sadio do tecido. Comparando informações de ambos os tecidos, é possível detectar alterações de expressão envolvidas na iniciação e progressão neoplásica. O tecido da mama contralateral é uma importante fonte para o estudo de expressão proteica não tumoral, em função da localização em relação ao tumor, caracterizando-o como uma referência relevante na comparação com o perfil proteômico do tecido tumoral.

Considerando que são necessários cerca de seis a oito anos para que um tumor seja clinicamente detectável (TOILLON et al., 2007), há uma dificuldade em se estabelecer um perfil de “normalidade”, pois o que é considerado não tumoral já pode estar nas etapas iniciais da carcinogênese, com efeitos na expressão proteica, por exemplo. Daí a importância da análise de um tecido considerado não tumoral.

Hoodermark e colaboradores (2008) também indicam a dificuldade de definir um estado referencial para o tecido mamário não tumoral já que este passa por repetidos ciclos de alterações hormonais, em função do ciclo menstrual, o que, por sua vez, modifica constantemente o perfil protéico expresso pelas células. Sendo assim, torna-se necessário o conhecimento sobre o tecido saudável em diferentes condições fisiológicas para, então, compreender o que está sendo alterado no funcionamento desse tecido quando comprometido pela neoplasia.

As constantes mudanças hormonais, que refletem em diferenças de expressão proteica, podem explicar, em parte, a variação observada no número de *spots* detectados para cada paciente.

6.3 IDENTIFICAÇÃO PROTEICA

A obtenção de espectros de massa adequados para uma identificação proteica válida está sujeita a uma série de variáveis, dentre as quais destaca-se a quantidade de peptídeos do *spot*, a calibração (externa e interna) do equipamento e a intensidade do *laser* durante a ionização dos peptídeos. A presença de contaminantes, sinais de matriz e a quantidade de ruído também podem interferir no padrão de picos de massa, comprometendo as informações a serem comparadas com o banco de dados *Swiss-Prot*, na plataforma MASCOT.

Um dos principais obstáculos encontrados durante a etapa de identificação das proteínas foi a baixa concentração de peptídeos obtida após a digestão trípica dos *spots*. O motivo foi o fato de o *spot* ter sido retirado de apenas um ou dois géis e não ter sido realizado o procedimento de concentração, o que resultou em poucos fragmentos peptídicos em solução. Mesmo com esta etapa, os *spots* cujos resultados foram negativos ou insatisfatórios foram novamente excisados dos géis bidimensionais, desta vez de várias replicatas, e concentrados após a digestão trípica. Para a maioria dos *spots*, o resultado foi positivo, com espectros de massa válidos para a identificação das proteínas; embora, tenham sido observados resultados não significativos de acordo com os parâmetros utilizados para a identificação na plataforma MASCOT.

Conforme descrito em Material e Métodos, devem ser satisfeitos pelo menos dois dos critérios de identificação, sendo eles: *score*, percentual de cobertura de sequência e número de peptídeos sobrepostos. As diferenças entre os valores teóricos e observados de massa molecular e ponto isoelétrico foram avaliados conforme os parâmetros $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$, provenientes do estudo de Dupont e colaboradores (2005), no qual foram analisados o proteoma e o secretoma de células musculares lisas arteriais. As proteínas identificadas e suas respectivas bandas são consideradas como observadas na posição esperada nos géis quando seguem tal padrão. Das 48 identificações positivas, 27 (56,25%) foram observadas de acordo com o esperado, 4 (8,3%) diferiram em MM, 9 (18,75%) quanto ao pI e 8 (16,67%) não estavam de acordo com o esperado, ocorrendo fora das margens propostas.

Em alguns casos, diferentes *spots* foram identificados como sendo a mesma proteína. Estes correspondem a diferentes isoformas da mesma proteína, as quais

possuem diferentes valores de MM e pI. Das 36 proteínas identificadas, 9 (25%) estavam representadas por mais de um *spot*, sugerindo a ocorrência de modificações pós-traducionais (MPT), uma vez que estas são responsáveis por alterar a MM e o pI das proteínas (MAYR et al., 2005).

Geralmente, as MPTs são necessárias para que as proteínas exerçam sua função biológica ou sejam inativadas (ONG e PANDEY, 2001). Além de alterar propriedades físicas e químicas, as MPTs também estão implicadas na conformação, dobramento, estabilidade, localização e atividade das proteínas, refletindo em sua função (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008).

Informações do banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot* para as proteínas identificadas indicam que as MPTs mais frequentes incluem a glicosilação, acetilação e fosforilação; a formação de pontes dissulfeto também é relatada para a maioria das proteínas. A fosforilação é a modificação mais comum e está relacionada a diversos processos celulares; resulta na alteração do pI, de acordo com a quantidade de resíduos fosforilados, deslocando-o no sentido ácido (KUMAR et al., 2004; ZHU et al., 2005). A acetilação também altera o pI no sentido ácido, devido ao aumento de cargas negativas causado pela substituição de grupamentos amino (positivamente carregados) de lisinas por grupos acetil (carga negativa) (RAMOS e BORA, 2004). A glicosilação consiste em cadeias de açúcares anexadas às proteínas, sendo responsável por influenciar a variação de massa.

6.3.1 CLASSES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

6.3.1.1 Citoesqueleto e proteínas associadas

O citoesqueleto consiste em um sistema complexo e dinâmico composto por proteínas estruturais formando polímeros (actina, tubulina e filamentos intermediários) e diversas proteínas associadas com funções regulatórias. Está direta ou indiretamente envolvido em diversos processos celulares importantes como, polaridade celular, adesão, transporte intracelular e transdução de sinal (MINAFRA et al., 2006).

A reorganização do citoesqueleto é o mecanismo primário de motilidade celular e é essencial para a maioria dos tipos de migração celular, um passo crítico para a invasão e metastização de tumores (YAMAZAKI, KURISU e TAKENAWA, 2005).

Dentre os 48 *spots* identificados, 5 correspondem a 9 proteínas desta classe, totalizando 25% das proteínas observadas neste estudo, sendo as actinas o tipo mais frequente. Dentre tais proteínas estão: as actinas citoplasmáticas 1 (ACTB) e 2 (ACTG); actinas do músculo esquelético gama-entérica (ACTH) e aórtica (ACTA); tubulinas cadeia alfa-1A (TUBA1A), 1B (TUBA1B) e 1C (TUBA1C); vimentina (VIME); e citoqueratina 14 tipo I (CK14).

As actinas são proteínas altamente conservadas evolutivamente e são fundamentais para as células eucarióticas. A semelhança entre elas dificulta a distinção por PMF, sendo frequentemente descrita a detecção de actinas simultaneamente em um mesmo *spot* (DUPONT *et al.*, 2005; MINAFRA *et al.*, 2006; COSTA, 2010).

A ACTB e a ACTG são codificadas pelos genes *ACTB* (localizado em 7p15-p12) e *ACTG* (em 17q25), respectivamente, e possuem homologia, diferindo apenas em quatro aminoácidos na região amino-terminal. Neste estudo, ambas foram identificadas simultaneamente em dois *spots*. Também foram indicadas simultaneamente as actinas do músculo liso gama-entérica (ACTH) e do músculo liso aórtico (ACTA) para um único *spot*. A primeira é codificada pelo gene *ACTG2* (em 2p13.1) e a segunda por *ACTA2* (em 10q23.3) (NCBI, 2013). Para ambos os casos, foram observados os mesmos valores de *score*, cobertura de sequência e número de massas pareadas, critérios estes obtidos satisfatoriamente para a identificação. Os quatro tipos de actinas foram considerados no número total de proteínas identificadas. Para distinção entre os tipos de actina presente em tais *spots* se faz necessária a obtenção da sequência de aminoácidos através de espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS).

As tubulinas cadeia alfa-1A, 1B e 1C foram identificadas simultaneamente num mesmo *spot*, apresentando os mesmos valores de *score*, cobertura de sequência e número de massas pareadas; no entanto, dentre tais critérios de identificação, foi obtido um valor insatisfatório para o percentual de cobertura, que chegou a 11%, quando o ideal é acima de 20%, e os demais foram obtidos próximos aos limites de aceitação. As três foram contabilizadas no número total de

proteínas identificadas no estudo. Tais proteínas são codificadas pelos genes *TUBA1A*, *TUBA1B* e *TUBA1C* (todos localizados em 12q13.12) (NCBI, 2013). Os heterodímeros de tubulinas alfa e beta representam os principais componentes dos microtúbulos (envolvidos em processos essenciais, como divisão celular, motilidade ciliar e flagelar e transporte intracelular), arranjadas de modo a definir polaridade e propriedades diferentes aos pólos dos mesmos, enquanto a tubulina gama possui papel importante na montagem do mesmo (McKEAN, VAUGHAN e GULL (2001). As tubulinas formam uma superfamília de proteínas, na qual as tubulinas alfa e beta apresentam maior similaridade entre si, sendo amplamente conservadas entre as espécies (OAKLEY, 2010).

Os filamentos intermediários compõem o terceiro maior componente do citoesqueleto e são essenciais nas funções biomecânicas da célula, evitando o estiramento excessivo da mesma (QIN et al., 2009). A vimentina e a queratina do citoesqueleto tipo I - 14, também chamada de citoqueratina 14, são membros desse grupo de proteínas. Segundo QIN e colaboradores (2009), proteínas da família dos filamentos intermediários possuem expressão variável em tipos celulares distintos e seus tumores correspondentes.

A VIME, codificada pelo gene *VIM* (localizado em 10p13) é expressa em várias células não epiteliais, especialmente nas células mesenquimais (por exemplo, fibroblastos e miofibroblastos), sendo considerada como um marcador de origem celular mesenquimal (CHALLA e STEFANOVIC, 2011; NCBI, 2013). É responsável pela manutenção do formato da célula, integridade do citoplasma e estabilização das interações, funcionando como organizadora de uma série de proteínas críticas envolvidas na migração e sinalização celular. Além disso, está envolvida na resposta imune e controle do transporte de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) derivadas do colesterol do lisossomo ao sítio de esterificação (NCBI, 2013). Essa proteína foi identificada com altos valores de *score*, cobertura de sequência e peptídeos pareados, além de apresentar ΔMM e Δpl que permitem inferir que seu respectivo *spot* foi observado na posição esperada nos géis, uma vez que as variações estavam dentro do limite aceitável.

A CK14, identificada no presente estudo, é codificada pelo gene *KRT14* (localizado em 17q12-q21). Dentre os critérios considerados para a identificação, o percentual de cobertura de sequência não foi satisfatório, mas revelou um valor de 18%, próximo ao ideal. Além disso, a ΔMM e Δpl não ficaram nos limites aceitáveis e

o fato de apenas 11 dos 44 peptídeos encontrados estarem sobrepostos com o banco de dados sugerem a necessidade de submeter esse *spot* novamente à MS.

As queratinas são as principais proteínas estruturais das células epiteliais, consistindo em um tipo de polipeptídeo fibroso com diâmetro de 7-11nm, cuja função básica é conferir resistência mecânica às mesmas (BOUSQUET *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2008). As diferenças de expressão de citoqueratinas (CK) são amplamente utilizadas para diferenciar os subtipos epiteliais na glândula mamária, sendo CK19 para células luminiais ductais, CK18 para células luminiais alveolares e CK14 para células mioepiteliais (HASSIOTOU e GEDDES, 2012). O estudo de Trask e colaboradores (1990) revelou um padrão diferencial de expressão de queratinas (K) entre linhagens celulares tumorais e não tumorais, sendo que as primeiras apresentaram expressão de K8, K18, K19, enquanto as células não tumorais expressaram K5, K6, K7, K14 e K17.

6.3.1.2 Enzimas metabólicas

As enzimas metabólicas constituem 13,9% das proteínas identificadas, sendo elas: subunidade beta da ATP sintase mitocondrial (ATPB); subunidade 1 do complexo citocromo bc1 mitocondrial (QCR1); adenosilhomocisteinase (SAHH); álcool desidrogenase [NADP+] (AK1A1); e glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD+] (GPDA).

Neste estudo, foram identificadas duas subunidades distintas que compõem diferentes complexos da cadeia respiratória mitocondrial, a ATPB e a QCR1. Ambas as identificações obtiveram altos valores de *score*, cobertura de sequência, e peptídeos sobrepostos, além de apresentar ΔMM e Δpl dentro dos padrões considerados.

A cadeia respiratória mitocondrial compreende um sistema composto essencialmente pela cadeia de transporte de elétrons (complexos I ao IV) e pelo complexo da ATP sintase (complexo V). A proteína QCR1 é codificada pelo gene *UQCRC1* (localizado em 3p21.3) e compõe o complexo ubiquinol-citocromo c redutase (complexo III ou citocromo bc1), que faz parte da cadeia respiratória mitocondrial (NCBI, 2013). Também denominado citocromo bc1, o complexo é formado por 11 subunidades e catalisa a oxidação da coenzima Q (reduzida) pelo

citocromo c. A enzima ATPB é codificada pelo gene *ATP5B* (localizado em 12q13.13) e compõe a ATP sintase mitocondrial, que catalisa a síntese de ATP a partir de um gradiente eletro-químico de prótons através da membrana interna da mitocôndria, que ocorre durante a fosforilação oxidativa (NCBI, 2013).

A proteína SAHH foi identificada com todos os critérios para a identificação satisfeitos, exceto a cobertura de sequência, que foi de 16%. A Δ MM e Δ pl dentro do padrão considerado indicam que a posição observada do *spot* foi condizente com a esperada. É codificada pelo gene *AHCY* (localizado em 20q11.22) e tem por função catalisar a hidrólise reversível da S-adenosilhomocisteína (SAH) à adenosina e L-homocisteína, regulando a concentração intracelular de SAH, o que também implica em um papel no controle das reações de metilação (YANG *et al.*, 2003; NCBI, 2013).

Também conhecida como aldeído redutase, a enzima AK1A1, é codificada pelo gene *AKR1A1* (localizado em 1p33-p32) e pertence à superfamília das aldose redutases, que consiste em mais de 40 enzimas e proteínas já descritas (NCBI, 2013). É expressa em praticamente todos os tecidos e está envolvida na detoxificação redutiva de aldeídos reativos (biogênicos e xenobióticos) e pode modificar macromoléculas celulares (BARSKY *et al.*, 2004; NCBI, 2013). Dentre os critérios de identificação, somente o percentual de cobertura de sequência, de 12%, não foi satisfatório e para os peptídeos sobrepostos apenas o número mínimo (4) foi atingido, o que também decorre da baixa quantidade de peptídeos encontrados para este *spot* (5). Para melhorar a confiabilidade do resultado pode ser relevante ressubmeter o *spot* à identificação.

O gene *GPD1* (localizado em 12q12-q13) codifica a enzima GPDA, um membro da família de enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD-dependentes que desempenha um papel importante no metabolismo de carboidratos e lipídios, catalisando a conversão reversível de diidroxicetona fosfato (DHAP) e redução de NADH a glicerol-3-fosfato (G3P) e NAD⁺ (NCBI, 2013). Esta identificação concorda com todos os critérios, revelando valores altos de *score*, cobertura de sequência e peptídeos pareados; no entanto, foi observada uma diferença de 0,66 no pl em relação ao esperado, variando sutilmente do padrão considerado de < 0,6. Para MM, a variação foi condizente com tais parâmetros.

6.3.1.3 Chaperonas Moleculares

Chaperonas e outras enzimas auxiliam no dobramento das proteínas, um processo importante para a aquisição da conformação nativa e funcional das mesmas, na qual as cadeias lineares de polipeptídeos são convertidas em estruturas tridimensionais. Durante o dobramento, são formadas pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteínas, conferindo estabilidade a proteína ou permitindo sua ligação covalente a outras proteínas (WILKINSON e GILBERT, 2004).

Neste estudo, apenas um *spot*, correspondente à proteína dissulfeto isomerase (PDIA1), uma chaperona molecular do retículo endoplasmático, representou essa classe, constituindo 2,8% das proteínas identificadas. Para essa identificação, todos os critérios foram atendidos, exceto para o percentual de cobertura de sequência que ficou abaixo do considerado satisfatório, em 11%.

Codificada pelo gene *P4HB* (localizado em 17q25), a PDIA1 é uma proteína multifuncional que catalisa a formação (oxidação) e o rearranjo (isomerização) de pontes dissulfeto, bem como a quebra (redução) daquelas incorretas (ELLSGAARD e RUDDOCK, 2005; NCBI, 2013). Tal processo ocorre no lúmen do retículo endoplasmático, cujo ambiente provê as condições redox e de pH requeridas para o dobramento das proteínas, bem como o acesso a chaperonas e demais proteínas de dobramento, dentre as quais a PDIA1 (NOIVA, 1999).

6.3.1.4 Proteínas associadas a membrana com múltiplas atividades

Pertencente a esta classe, a proteína de canal de cloreto intracelular tipo I (CLIC1) foi identificada em dois *spots*, o que corresponde a 2,8% das proteínas identificadas no estudo. Para ambos os casos, foram atendidos os critérios de identificação, sendo observados valores satisfatórios para cada um; no entanto, para um dos casos, o percentual de cobertura ficou ligeiramente abaixo do ideal, com 19%. Em relação à ΔMM e ΔpI , ambos apresentaram valores condizentes com os padrões considerados, sendo que para o pI foram observadas pouca ou nenhuma variação.

É codificada pelo gene *CLIC1* (localizado em 6p21.3) e pertence a um grupo diverso de proteínas, mais especificamente à família p64, que regulam processos

celulares fundamentais, incluindo estabilização do potencial de membrana celular, transporte transepitelial, manutenção do pH intracelular e regulação do volume celular. Pode formar canais de íon cloreto nas membranas celulares plasmáticas e nucleares, sendo encontrada principalmente nestas últimas (NCBI, 2013).

6.3.5 Proteínas com funções de ligação/ transporte

A maior classe de proteínas identificadas no presente estudo consiste em proteínas com funções de ligação/ transporte, sendo representada por 38,9% das proteínas observadas. Entre elas: sorotransferrina (TRFE); hemopexina (HEMO); antitrombina III (ANT3); glicoproteína alfa-2-HS (FETUA); soro albumina (ALBU); cadeia beta do fibrinogênio (FIBB); antitripsina alfa-1(A1AT); proteína de ligação à vitamina D (VTDB); cadeia gama do fibrinogênio (FIBG); inibidor de ribonuclease (RINI); haptoglobina (HPT); componente amiloide P do soro (SAMP); apolipoproteína A-I (APOA1); e proteína ligadora de retinol 4 (RBP4).

As proteínas TRFE e HPT estão envolvidas no transporte do ferro, permitindo sua distribuição pelo organismo em uma forma redox-inativa, o que é essencial uma vez que o ferro livre no plasma pode ser tóxico por causar danos oxidativos nos tecidos. O ferro também tem papel na replicação do DNA por atuar como co-fator de várias enzimas, incluindo a ribonucleotídeo redutase.

A TRFE, codificada pelo gene *TF* (localizado em 3q22.1), se liga ao ferro e promove seu transporte do intestino, sistema retículo-endotelial e células parenquimais do fígado para todas as células em proliferação (NCBI, 2013). Também está implicada em atividades de crescimento e diferenciação celular (GOMME e McCANN, 2005; NCBI, 2013).

A HPT é codificada pelo gene *HP* (localizado em 16q22.1) e sintetizada no fígado, no tecido adiposo e no pulmão, conferindo proteção antioxidante e antimicrobiana (DOBRYSYCKA, 1997; NCBI, 2013). É uma proteína ligante de hemoglobina abundante no plasma, onde se combina com as hemoglobinas livres, prevenindo a eliminação de ferro pelos rins e o dano renal pela hemólise, enquanto permite o acesso de enzimas degradativas à hemoglobina (WASSEL, 2000; NCBI, 2013).

Para as proteínas TRFE e HPT, identificadas em um e quatro *spots*, respectivamente, a maioria das identificações atendeu aos critérios de identificação, sendo que apenas uma delas, referente à HPT, revelou baixa cobertura de sequência, com 13%, mas o *score* foi de 100. Apenas para a HPT foram observados valores de ΔpI que diferem do padrão, sendo observado um valor menor que o esperado, provavelmente relacionado a MPTs descritas no banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*; as demais variações observadas foram condizentes com o padrão adotado. No estudo de Dupont e colaboradores (2005), a proteína HPT também foi encontrada em diferentes *spots* com MM próxima a 43 kDa e pI entre 4,8-5,6; dados estes parecidos com os observados no presente estudo.

A glicoproteína plasmática HEMO, identificada em dois *spots*, é codificada pelo gene *HPX* (localizado em 11p15.5-p15.4) e se liga ao grupo heme com alta afinidade, transportando-o do plasma para o fígado para sua recuperação e recuperação do ferro; a hemopexina livre retorna à circulação. Também pode estar envolvida na proteção das células ao estresse oxidativo (NCBI, 2013). Para ambos os *spots*, os critérios de identificação foram atendidos, exceto a cobertura de sequência, que ficou próximo ao ideal, em 18% para os dois. Entretanto, nos dois casos a ΔMM e ΔpI não estiveram dentro dos padrões, sendo que já foram relatadas glicosilações nesta proteína no banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*.

A proteína ANT3 pertence à família serpina (*serine protease inhibitor*), da qual também faz parte a proteína A1AT. Ambas são inibidoras de serina protease, cuja função envolve processos biológicos como a coagulação sanguínea, ativação do sistema complemento, apoptose, angiogênese, inflamação e supressão de tumor (VAN GENT *et al.*, 2003). Codificada pelo gene *SERPINC1* (localizado em 1q25.1), a ANT3 é o inibidor de serina protease mais importante no plasma, inibindo a trombina e outras serina proteases do sistema de coagulação, regulando a cascata de coagulação. A A1AT é codificada pelo gene *SERPINA1* (localizado em 14q32.1) e seus alvos são a elastase, plasmina, trombina, quimiotripsina e ativador de plasminogênio (NCBI, 2013). Para essas duas proteínas, todos os critérios de identificação foram atendidos, apresentando valores altos para cada um. Em relação a ΔMM e ΔpI , os valores obtidos ficaram dentro do padrão, exceto para a ΔpI de ANT3, que ficou em 1,24, em contraste com valores ideais $< 0,6$, provavelmente em função das MPTs.

A glicoproteína FETUA, identificada em dois *spots*, é codificada pelo gene *AHSG* (localizado em 3q27) e sintetizada por hepatócitos. Está presente no soro sanguíneo e possui envolvimento em várias funções, como endocitose, desenvolvimento cerebral e formação de tecido ósseo e apresenta afinidade por íons cálcio e bário (NCBI, 2013). A identificação nesses dois *spots* apresentou apenas dois critérios satisfeitos, o *score* e o número de peptídeos sobrepostos; o percentual de cobertura foi de 15% para ambos e a ΔMM e ΔpI ficou fora dos padrões considerados, o que pode ser justificado pela ocorrência de MPTs, conforme relatado no *UniProtKB / Swiss-Prot* para essa proteína, incluindo a formação de pontes dissulfeto, glicosilação e fosforilação. Valores semelhantes aos encontrados neste estudo também foram observados por Dupont e colaboradores (2005), sendo obtidas MM de 59,07 e pI 4,7.

Dentre as proteínas desta classe, a ALBU foi a mais frequente, sendo identificada em 5 *spots*, seguida da HPT. É codificada pelo gene *ALB* (localizado em 4q13.3) e compreende aproximadamente metade do conteúdo proteico do soro sanguíneo (NCBI, 2013). Suas principais funções incluem a regulação da pressão osmótica coloidal do sangue e o transporte de esteroides, ácidos graxos, íons e hormônios tireoidianos (DENG, *et al.*, 2006; NCBI, 2013). Atua na estabilização do volume de fluido extracelular e é a principal proteína transportadora de zinco no plasma (NCBI, 2013). A partir dos valores de pI e MM observados, pode-se concluir que a identificação corresponde a isoforma 2 da albumina. Três *spots* (793, 795 e 1023) geraram *score* muito próximo ao valor mínimo para $p < 0,05$ e um percentual de cobertura muito baixo, sendo necessária uma nova análise em espectrometria de massas para melhorar a confiabilidade da identificação.

O fibrinogênio é uma glicoproteína fibrosa e solúvel, constituída por três pares de cadeias polipeptídicas, designadas alfa, beta e gama, mantidas unidas por pontes dissulfeto; quando clivada em fibrina pela trombina, forma o coágulo (WEISEL, 2005). Dessa forma, o fibrinogênio e a fibrina têm papéis sobrepostos na coagulação sanguínea, resposta inflamatória, regeneração de tecidos, adesão célula-matriz e neoplasia (MOSESSON, 2005). Neste estudo, foram identificadas as proteínas que codificam as cadeias beta e gama do fibrinogênio (FIBB e FIBG, respectivamente), sendo que a primeira foi observada em 4 *spots* diferentes e a última em apenas um. Os genes *FGB* e *FGG* (ambos localizados em 4q28) codificam a cadeia beta e a cadeia gama do fibrinogênio, respectivamente (NCBI, 2013). Para essas proteínas,

os critérios de identificação foram satisfeitos. Quanto a ΔMM e Δpl , todos os *spots*, exceto um (referente à FIBB) apresentaram ΔMM condizente com o padrão considerado; em relação a Δpl , apenas para o FIBG o valor estava dentro do padrão, enquanto que todos os *spots* de FIBB ficaram fora deste, possivelmente pela ocorrência de MPT. Para essa proteína, o *score* e o número de peptídeos sobrepostos de todos os *spots* foram altos o suficiente para possibilitar a identificação.

Outra proteína observada nesta classe foi a VTDB, codificada pelo gene GC (localizado em 4q12 -q13) e que pertence à família de genes da albumina, sendo altamente expressa no plasma. Sua principal função é se ligar a vitamina D, a seus metabólitos plasmáticos e transportá-los aos tecidos alvo (NCBI, 2013). É sintetizada predominantemente no fígado, mas também é encontrada em outros fluidos além do plasma, incluindo o cérebro-espinhal, o leite e é expressa na superfície de muitas células (GOMME e BERTOLINI, 2004). Para essa identificação, apenas a cobertura de sequência foi insuficiente, com valor de 12%.

Codificada pelo gene *RNH1* (localizado em 11p15.5), a proteína RINI se liga a ribonucleases tipo pancreáticas tornando-as inativas. É expressa no citoplasma da maioria das células. O papel biológico dessas proteínas ainda não é bem estabelecido, sabe-se que podem proteger as células, regulando ou bloqueando a atividade de ribonucleases com funções intracelulares e monitorar o estado de oxidação das células em resposta a fatores como o envelhecimento e o estresse oxidativo (DICKSON, HAIGIS e RAINES, 2005). Além disso, estão envolvidas na angiogênese, bloqueando a atividade ribonucleotídica da angiogina por ligar-se a esta (DICKSON *et al.*, 2009). Os valores obtidos para *score*, cobertura de sequência e peptídeos pareados foram adequados para a identificação, uma vez que tais critérios foram alcançados.

Outra proteína comumente detectada no plasma foi identificada neste estudo, a SAMP, sendo atendidos todos os critérios para sua identificação, incluindo a ΔMM e Δpl . Trata-se de uma glicoproteína, pertencente às pentraxinas, uma família de proteínas altamente conservada cujos membros são conhecidos por se ligarem a vários ligantes na dependência de cálcio (KIERNAN *et al.*, 2004). É codificada pelo gene *APCS* (localizado em 1q21-q23) e também pode interagir com o DNA e histonas (NCBI, 2013). Dentre as funções sugeridas para o SAMP também estão a

atividade chaperona e o envolvimento com a regulação da degradação da cromatina (BICKERSTAFF, 1999; NCBI, 2013).

Codificada pelo gene *APOA1* (localizado em 11q23-q24), a APOA1, que é sintetizada no fígado e no intestino, é principal proteína componente do colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) no plasma. Apolipoproteínas apresentam um papel importante no metabolismo e transporte de lipídeos. Essa proteína promove o efluxo de colesterol dos tecidos para o fígado para a excreção e atua como co-fator da colesterolaciltransferase (LCAT) na formação dos ésteres colesteril (NCBI, 2013). Além disso, é responsável pela proteção das células contra a toxicidade dos lipopolissacarídeos, se ligando a estes de forma a neutralizá-los (MA *et al.*, 2004). Essa proteína foi identificada com altos valores de *score*, cobertura de sequência e peptídeos pareados. A ΔMM e Δpl ficou dentro dos padrões considerados.

A RBP4 é codificada pelo gene *RBP4* (localizado em 10q23-q24), pertence à família das lipocalinas, e é um transportador específico para o retinol (vitamina A) distribuindo-o do fígado para os tecidos periféricos. No plasma, o complexo RBP-retinol interage com a transtirretina, prevenindo sua perda pela filtração nos rins (NCBI, 2013). Sua identificação está de acordo com os critérios anteriormente citados e a ΔMM e Δpl também foi condizente com os padrões.

6.3.1.6 Crescimento celular e reguladores da proliferação

Esta classe foi representada por 2,8% das identificações e corresponde à proteína 14-3-3 épsilon (1433E); os critérios de identificação e a ΔMM e Δpl foram satisfeitos. Codificada pelo gene *YWHAE* (localizado em 17p13.3), a proteína 1433E pertence à família 14-3-3, um grupo de moléculas reguladoras conservadas expressa em todas as células eucarióticas (NCBI, 2013). Proteínas 14-3-3 estão envolvidas na regulação de um amplo espectro de vias de sinalização gerais e especializadas, uma vez que possui capacidade de se ligar a múltiplas proteínas de sinalização, incluindo quinases, fosfatases e receptores transmembrana. A multiplicidade de interações permite a essa família desempenhar papéis importantes em uma série de processos vitais de regulação, como transdução de sinal mitogênico, apoptose e controle do ciclo celular (FU, SUBRAMANIAN e MASTERS, 2000; UniProtKB, 2013).

6.3.1.7 Detoxificação e proteínas redox

Esta classe compreende enzimas que realizam papéis importantes no catabolismo celular e na proteção contra estresses metabólicos, sendo o controle da redução/oxidação (redox) um processo fundamental para manter a homeostase do organismo (MINAFRA *et al.*, 2006).

Pertencente a esta classe, foi identificada a proteína peroxiredoxina-2 (PRDX2), representado 2,8% das identificações. Foram satisfeitos os critérios de identificação e a ΔMM e Δpl permitem inferir que a localização observada do *spot* foi condizente com a esperada. A PRDX2 é codificada pelo gene *PRDX2* (localizado em 19p13.2) e pertence à família de peroxidases homodiméricas, que consiste em enzimas envolvidas na regulação redox da célula, reduzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água e hidroperóxidos alquil à álcool, eliminando peróxidos gerados durante o metabolismo (NCBI, 2013; UniProtKB, 2013). As peroxiredoxinas podem ter um efeito proliferativo, uma vez que participam de cascatas de sinalização de fatores de crescimento, e papel no desenvolvimento e progressão do câncer (NCBI, 2013).

6.3.1.8 Biossíntese de proteínas

A proteína ribossomal 40S (RSSA) pertence a esta classe e corresponde a 2,8% das proteínas identificadas, atendendo todos os critérios de identificação, exceto a ΔMM . É codificada pelo gene *RPSA* (localizado em 3p22.2) e possui sequência de aminoácidos evolutivamente conservada, o que sugere a importância biológica da proteína. Dentre outras denominações, a RSSA também é conhecida como receptor de laminina 1 e medeia os efeitos das lamininas, as principais constituintes não-colágenas de membranas basais, que estão envolvidas em uma variedade de processos celulares como adesão celular, diferenciação, migração, sinalização e, entre outros, metástase (NCBI, 2013). Evidências sugerem que a RSSA é um componente da maquinaria traducional, associada à subunidade 40S ribossomal, sendo essencial para a síntese protéica (ARDINI *et al.*, 1998).

6.3.1.9 Proteínas com outras funções

Esta classe é composta por 8,3% das proteínas identificadas, sendo elas: mimecan (MIME); glicoproteína 4 associada à microfibrila (MFAP4); e cadeia J da imunoglobulina (IGJ).

A proteína MIME, também conhecida como osteoglicina, foi identificada em dois *spots* e é codificada pelo gene *OGN* (localizado em 9q22) (NCBI, 2013). Essa proteína pertence à família dos proteoglicanos, mais especificamente aos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (*small leucin-rich proteoglycans* - SLRP) e é um dos componentes da matriz extracelular. Tem sido associada a integridade desta, atuando na regulação da fibrilogênese do colágeno, da arteriogênese e da massa ventricular esquerda. Além de atuar na regulação da estrutura da matriz, tais proteínas também participam da regulação do ciclo celular e modulam a atividade de fatores de crescimento (IOZZO, 1997; BARASCUK *et al.*, 2011). Sua identificação apresentou todos os critérios satisfeitos para um dos *spots*, enquanto que para o outro os valores foram muito próximos aos limites ideais, sendo que a cobertura de sequência não foi satisfeita, compreendendo 15% da sequência do banco de dados.

A glicoproteína MFAP4 é codificada pelo gene *MFAP4* (localizado em 17p11.2) e apresenta especificidade de ligação por colágeno e carboidratos (NCBI, 2013). Suas características estruturais, como a sequência de aminoácidos N-terminal que serve para a ligação de integrina, sugerem que é uma proteína de matriz extracelular envolvida na adesão celular dependente de cálcio ou interações intercelulares (ZHAO *et al.*, 1995; MURAOKA *et al.*, 2012). Os critérios para sua identificação foram atendidos, embora tenham sido próximos aos limites para tanto; a ΔMM ficou fora do padrão considerado, sendo observado um valor maior que o esperado, o que pode ser justificado pela ocorrência de glicosilação, a MPT descrita para essa proteína no banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*. A cobertura de sequência foi insuficiente, sendo de 15%.

A IGJ foi identificada em dois *spots*, estando de acordo com os critérios para a identificação; em relação a ΔMM e ΔpI , ambas diferiram dos padrões, revelando que os *spots* não foram observados em suas posições esperadas, de acordo com os dados teóricos do banco de dados. Codificada pelo gene *IGJ* (localizado em 4q21), essa proteína serve para a ligação de duas unidades monoméricas de IgM ou IgA e também auxilia na ligação dessas imunoglobulinas ao componente secretório (NCBI,

2013). Dentre as MPTs descritas para esta proteína, as glicosilações poderiam explicar a variação de massa. Por possuir uma baixa MM, qualquer adição de grupamento de carboidrato ocasiona uma variação acentuada no percentual de Δ MM, quando comparado com o efeito de tal modificação em proteínas com maior MM.

6.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM OUTRAS ANÁLISES PROTEÔMICAS REALIZADAS POR NOSSO GRUPO DE PESQUISA

As identificações obtidas no presente estudo fornecem informações adicionais para a caracterização do tecido mamário não tumoral que, com as análises do tecido tumoral, se constitui no objetivo principal das análises proteômicas do nosso grupo de pesquisa. Além de ampliar o conhecimento sobre o tecido mamário saudável, os resultados aqui apresentados reforçam as identificações anteriores, já que várias proteínas encontradas no tecido contralateral foram descritas no tecido adjacente ao tumor conforme os dados de Costa (2010). Esse autor identificou 44 proteínas expressas em amostras do quadrante oposto ao tumor, respeitando a margem de segurança de 1cm, distância limite além da qual o tecido pode ser considerado livre de células neoplásicas.

Dentre as proteínas identificadas tanto no tecido adjacente (Costa 2010) como no contralateral (presente estudo), pode-se destacar: TRFE, ANT3, FIBB, FIBG, ATBP, VIME, A1AT, HPT, GPDA e APOA1, todas apresentando, em ambos os estudos, altos valores de *score*, percentual de cobertura e número de peptídeos pareados. Valores similares dentro dos limites aceitáveis foram encontradas para as proteínas PDIA1, VTBD, ACTB/ACTG, SAMP e PRDX2. Em comum nos dois estudos, também foram encontrados diferentes tipos de cadeias de tubulina, citoqueratinas e proteínas pertencentes à família 14-3-3.

Kaviski (2010) analisou o tecido mamário tumoral identificando 44 proteínas diferentes. Muitas delas estão associadas a mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese mamária, como: regulação da divisão celular, organização do citoesqueleto, detoxificação de carcinógenos, diferenciação, adesão e apoptose.

Várias proteínas observadas no presente estudo são comuns às identificadas por Kaviski (2010): TRFE, A1AT, VIME e RINI, com altos valores de *score* e

percentual de cobertura de sequência; FIBG, ACTB/ACTG e CLIC1, com valores intermediários de *score*, porém similares; PDIA1, RSSA, 1433E, PRDX2, TUBA1B, ATPB e HPT, com diferentes valores para os critérios de identificação; e a expressão de outras cadeias de tubulina, tipos de citoqueratina e membros da família 14-3-3.

Essas proteínas, comumente expressas no tecido tumoral e não tumoral, participam naturalmente de processos celulares. No entanto, o nível de expressão e as alterações apresentadas podem ser diferentes, conferindo funções e mecanismos de ação distintos. Tais características podem contribuir para o estabelecimento e a progressão da neoplasia.

Kaviski (2010) cita diversos estudos que descrevem a expressão diferencial dessas proteínas em tecidos mamários tumorais e não tumorais, salientando o envolvimento das mesmas no processo carcinogênico, incluindo: crescimento e proliferação celular (TRFE, FIBG e HPT); desprendimento de células malignas de seu local de origem, regulação do crescimento e inibição da apoptose (A1AT); potencial invasivo, motilidade e transdução de sinais (VIME); transição epitélio-mesenquimal (co-expressão de citoqueratinas e VIME); síntese proteica (RSSA); alteração do ciclo celular, apoptose e adesão celular (CLIC1), entre outros.

Em comum entre os três estudos mencionados, estão as proteínas: TRFE, FIBG, ATPB, A1AT, PDIA1, ACTB/ACTG, VIME, HPT e PRDX2, além da expressão de membros da família das tubulinas e 14-3-3. Essa concordância pode ser um indicativo da importância dessas proteínas em processos essenciais para a manutenção da integridade celular.

Entre as proteínas observadas em comum somente com o tecido tumoral estão: 1433E, RINI, RSSA e CLIC1 e as identificadas somente no tecido não tumoral foram: ANT3, FIBB, GPDA, APOA1, VTBD e SAMP.

Proteínas encontradas em tecidos tumoral e não tumoral podem fornecer indícios sobre a expressão proteica nos mesmos, permitindo a obtenção de informações relevantes sobre a biologia do tecido mamário. Para alcançarmos este objetivo, deve-se ressaltar a necessidade de uma análise detalhada da expressão de proteínas em amostras de tecido mamário tumoral e não tumoral adjacente e contralateral ao tumor. Deve-se enfatizar, como já foi feito por Costa (2010) e Kaviski (2010), que muitas das informações acima apresentadas indicam a importância de estudos sobre as diferenças da expressão proteica para a precisa identificação de potenciais marcadores moleculares.

Os resultados obtidos no presente estudo serão acrescentados ao banco de dados de proteômica, que contém informações geradas em estudos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética que permitirão futuras comparações com tecidos neoplásicos, de tumores primários e de metástases axilares. Estes dados também ampliam os resultados já obtidos com tecido mamário não tumoral da mama adjacente ao tumor, o que permite uma melhor caracterização do tecido não tumoral. O desenvolvimento de outros estudos, contemplando um maior número de amostras e outras metodologias pode fornecer dados potencialmente capazes de informar sobre o perfil de expressão gênica e protéica da glândula mamária, contribuindo para o melhor conhecimento dos fatores envolvidos no estabelecimento da neoplasia.

7 CONCLUSÕES

Estudos com o objetivo de analisar os mecanismos de iniciação e progressão tumoral tornam-se fundamentais para a intervenção terapêutica e o desenvolvimento de medidas mais eficazes de detecção da doença. O conhecimento do tecido em estado saudável é essencial para a inferência de biomarcadores de estágios da carcinogênese.

No presente estudo, as classes funcionais mais abundantes compreenderam proteínas com atividade de ligação/transporte e de citoesqueleto, seguidas pela classe das enzimas metabólicas. Algumas proteínas foram encontradas em mais de um *spot*, indicando prováveis isoformas e a ocorrência de modificações pós-traducionais.

Considerando os estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, dentre as proteínas observadas nesse estudo, várias também foram identificadas no tecido mamário não tumoral adjacente, evidenciando a similaridade entre ambos os tecidos e reforçando o caráter referencial do tecido contralateral. Diversas proteínas também foram comuns àquelas encontradas no tecido mamário tumoral, para as quais alterações de expressão podem estar relacionadas ao processo de carcinogênese.

As informações apresentadas neste trabalho bem como nos de Costa (2010) e Kaviski (2010) enfatizam a importância de estudos sobre as diferenças da expressão proteica para a precisa identificação de potenciais marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

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

ANDERSSON, T.; JOHANSSON, M.; BOLMSJO, G.; JAMES, P. Automating MALDI sample plate loading. **Journal of Proteome Research**, vol. 6, n. 2, p. 894–896, 2007.

ARDINI, E.; PESOLE, G.; TAGLIABUE, E.; MAGNIFICO, A.; CASTRONOVO, V.; SOBEL, M. E.; COLNAGHI, M. I.; MÉNARD, S. The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 8, p. 1017-1025, 1998.

AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE & AUSTRALASIAN ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES (AIHW). **Cancer in Australia: an overview, 2010**. Canberra: 2010.

BARASCUK, N.; VASSILIADIS, E. ZHENG, Q.; WANG, W.; LARSEN, L.; RASMUSSEN, L. M.; KARSDAL, M. A. Levels of Circulating MMCN-151, a Degradation Product of Mimecan, Reflect Pathological Extracellular Matrix Remodeling in Apolipoprotein E Knockout Mice. **Biomark Insights**, v. 6, p. 97-106, 2011.

BARSKY, O. A.; PAPUSHA, V. Z.; KUNKEL, G. R.; GABBAY, K. H. Regulation of aldehyde reductase expression by STAF and CHOP. **Genomics**, v.83, n. 1, p. 119-129, 2004.

BIÈCHE, I.; CHAMPEME, M. H.; MATIFAS, F.; CROPP, C. R.; CALAHAN, R.; LIDEREAU, R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Research, Chicago**, v. 53, n. 9, p. 1950-1994, 1993.

BICKERSTAFF, M. C. M.; BOTTO, M.; HUTCHINSON, W. L.; HERBERT, J.; TENNENT, G. A.; BYBEE, A.; MITCHELL, D. A.; COOK, H. T.; BUTLER, P. J. G.; WALPORT, M. J.; PEPYS, M. B. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. **Nature Medicine**, v. 5, n 6, 1999.

BOUSQUET, O.; MA, L.; YAMADA, S.; GU, C.; IDEI, T.; TAKAHASHI, K.; WIRTZ, D.; COULOMBE, P. A. The nonhelical tail domain of keratin 14 promotes filament

bundling and enhances the mechanical properties of keratin intermediate filaments in vitro. **J. Cell Biol.**, v. 155, p. 747-754, 2001.

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

BRENNER, D. J. Contralateral second Breast Cancers: Prediction and Prevention. **JNCI**, v. 102, n. 7, p. 444-445, 2010.

BRISKEN, C.; PARK, S.; VASS, T.; LYNDON, J. P.; O'MALLEY, B. W.; WEINBERG, R. A. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5076-5081, 1998.

BRISKEN, C.; O'MALLEY, B. Hormone action in the mammary gland. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 12, p. 003178, 2010.

CALVO, K. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Clinical Proteomics: from biomarker Discovery and cell signaling to individualized personal therapy. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 1/2, p. 107-125, 2005.

CAMPBELL, L. L.; POLYAK, K. Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? **Cell Cycle**, v. 6, n. 19, p. 2332-2338, 2007.

CHABNER, B. A.; MURPHY, M. J. Jr. Breast cancer: a tale of two centuries: with implications for understanding cancer metastasis and cancer stem cell biology. **Oncologist**, vol. 10, n. 6, p. 369, 2005.

CHALLA, A. A.; STEFANOVIC, B. A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 18, p. 3773-3789, 2011.

CHEN, Y.; THOMPSON, W.; SEMENCIW, M.; MAO, Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 8, n. 10, p. 855-861, 1999.

CHEN, M. H. S.; YIP, G. W. C.; TSE, G. M. K.; MORIYA, T.; LUI, P. C. W.; ZIN, M. L.; BAY, B. H.; TAN, P. H. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. **Modern Pathology**, v. 21, p. 1183-1191, 2008.

CICHON, M. A.; DEGNIM, A. C.; VISSCHER, D. W.; RADISKY, D. C. Microenvironmental Influences that Drive Progression from Benign Breast Disease to Invasive Breast Cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 15, p. 389–397, 2010.

COLLETA, R. D.; CHRISTENSEN, K.; REICHENBERGER, K. J.; LAMB, J.; MICOMONACO, D.; HUANG, L.; WOLF, D. M.; MUELLER-TIDOW, C.; GOLUB, T. R.; KAWAKAMI, K.; FORD, H. L. The Six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin A1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 17, p. 6478–6483, 2004.

COSTA, G. G. **Análise proteômica de tecido mamário não tumoral em pacientes com câncer de mama**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/25523/Dissertacao%20Gustavo%20Costa%20FINAL.pdf;jsessionid=AEEBCC5F88F8F2DC5F1F251156F1064E?sequence=1>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2012.

COSTA, G. G.; KAVISKI, R.; SOUZA, L. E. R.; URBAN, C. A.; LIMA, R. S.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F. Proteomic analysis of non-tumoral breast tissue. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2430-2442, 2011.

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

DICKSON, K. A.; HAIGIS, M. C.; RAINES, R. T. Ribonuclease inhibitor: structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Molecular Biology**, v. 80, p. 349-374, 2005.

DICKSON, K. A.; KANG, D. K.; KWON, Y. S.; KIM, J. C.; LELAND, P. A.; KIM, B. M.; CHANG, S. I.; RAINES, R. T. Ribonuclease inhibitor regulates neovascularization by human angiogenin. **Biochemistry**, v. 48, n. 18, p. 3804-3806, 2009.

DJOVOV, V.; ADRES, A.; ZIEMIECKI, A. Vascular Remodelling During the Normal and Malignant Life Cycle of the Mammary Gland. **Microscopy Research and Technique**, v. 52, p. 182-189, 2001.

DOBRYSZYCKA, W. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 35, n. 9, p. 647-654, 1997.

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, n. 2, p. 585-596, 2005.

ELLGAARD, I.; RUDDOCK, L. W. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. **European Molecular Biology Organization Reports**, v. 6, n. 1, p. 28-32, 2005.

EXPASY. Disponível em <<http://www.expasy.ch/>> Acesso em: janeiro de 2013.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 Proteins: structure, function, and regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, n. 40, p. 617-647, 2000.

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

GALVÃO, E.R.C.G.N. Breast cancer proteomics: a review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, vol. 137, n. 6, p. 915-25, 2011.

GE HEALTHCARE Handbook. **2D – Electrophoresis: Principles and Methods**. Suécia: Editora Elanders Tofters, 2005. 162 p.

GEDDES, D. T. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 52, n. 6, p. 556-563, 2007.

GILLEY, D.; TANAKA, H.; HERBERT, B. S. Telomere dysfunction in aging and cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 37, n. 5, p. 1000-1013, 2005.

GJOREVSKI, N; NELSON, C. M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 12, n. 9, p. 581-593, 2011.

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

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

2000.

HARTMANN, P. E. The lactating breast: An overview from down under. **Breastfeed Med**, v. 2, p. 3-9, 2007.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, p. 29-48, 2012.

HONDERMARCK, H. Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 2, n. 5, p. 281-291, 2003.

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

HOWARD, B. A.; GUSTERSON, B. A. Human Breast Development. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 119-137, 2000.

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

HUGHES, K.; WICKENDEN, J. A.; ALLEN, J. E.; WATSON, C. J. Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. **Journal of Pathology**, v. 227, p. 106-117, 2012.

HUTSON, S. W.; COWEN, P. N.; BIRD, C. C. Morphometric studies of age related changes in normal human breast and their significance for evolution of mammary cancer. **J Clin Pathol**, v. 38, p. 281-287, 1985.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Estimativa 2012 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: janeiro de 2013.

IOZZO, R. V. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 32, n. 2, p. 141-174, 1997.

KAVISKI, R. **Análise proteômica de carcinomas primários de mama**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A.; TRAVIS, R. C. Nutrition and breast cancer. **The Breast**, v. 12, n. 6, p. 412-416, 2003.

KIERNAN, U. A.; NEDELKOV, D.; TUBBS, K. A.; NIEDERKOFER, E. E.; NELSON, R. W. Proteomic characterization of novel serum amyloid P component variants from human plasma and urine. **Proteomics**, v. 4, p. 1825–1829, 2004.

KIM, H.; COPE, M. B.; HERRING, R.; ROBINSON, G.; WILSON, L.; PAGE, G. P.; BARNES, S. 2D difference gel electrophoresis of prepubertal and pubertal rat mammary gland proteomes. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 11, p. 4638-4650, 2008.

KUMAR, Y.; KHACHANE, A.; BELWAL, M.; DAS, S.; SOMSUNDARAM, K.; TATU, U. ProteoMod: A new tool to quantitate protein post-translational modifications. **Proteomics**, v. 4, p. 1672–1683, 2004.

LOURO, I. D.; LERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**, 2 ed., São Paulo: MSG, 2002.

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

MAYR, U.; MAYR, M.; YIN, X.; BEGUM, S.; TARELLI, E.; WAIT, R.; XU, Q. Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, p. 4546-4557, 2005.

MASCOT. Disponível em <<http://www.matrixscience.com/>> Acesso em janeiro de 2013.

McCASKILL-STEVENS, W.; WILSON, J.; BRYANT, J.; MAMOUNAS, E.; GARVEY, L.; JAMES, J.; CRONIN, W.; WICKERHA, D.L. Contralateral breast cancer and thromboembolic events in african american women treated with tamoxifen. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 23, p. 1762-1769, 2004.

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

MEDINA, D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, n. 1, p. 5-19, 1996.

MEDINA, D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 1, p. 5-19, 1996.

MILIOLI, H. H. Z. **Análise proteômica comparativa de carcinomas esporádicos de mama e metástases axilares correspondentes.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/25666/Dissertacao.HeloisaHelenaZaccaronMilioli.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2012.

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

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1894-1904, 2005.

MURAOKA, S.; KUME, H.; WATANABE, S.; ADACHI, J.; KUWANO, M.; SATO, M.; KAWASAKI, N.; KODERA, Y.; ISHITOBI, M.; INAJI, H.; MIYAMOTO, Y.; KATO, K.; TOMONAGA, T. Strategy for SRM-based Verification of Biomarker Candidates Discovered by iTRAQ Method in Limited Breast Cancer Tissue Samples. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 4201-4210, 2012.

NANDI, S.; GUZMAN, R. C.; YANG, J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 9, p. 3650-3657, 1995.

NAVARRETE, M. A.; MAIER, C. M.; FALZONI, R.; QUADROS, L. G.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C.; NAZÁRIO, A. C. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 306-313, 2005.

NAYLOR, M.J.; GINSBURG, E.; IISMAA, T. P.; VONDERHAAR, B. K.; WYNICK, D.; ORMANDY, C. J. The neuropeptide galanin augments lobuloalveolar development. **J Biol Chem**, v. 278, n. 31, p. 29145-29152, 2003.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: janeiro de 2013.

NEVILLE, M. C.; MEDINA, D.; MONKS, J.; HOVEY, R.C. The mammary fat pad. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 3, n. 2, p109-116, 1998.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 49-66, 2002.

NGUYEN, B; KEANE, M.M.; JOHNSTON, P.G. The biology of growth regulation in normal and malignant breast epithelium: from bench to clinic. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 20, n. 3, p. 223-236, 1995.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Cell & Developmental Biology**, v. 10, p. 481-493, 1999.

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

OAKES, S. R.; HILTON, H. N.; ORMANDY, C. J. Key stages in mammary gland development - The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 2, 2006.

OAKLEY, B. R. An abundance of tubulins. **Cell Biology**, v. 10, p. 537-542, 2010.

OLDENBURG, R. A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C. J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, n. 2, p. 125-149, 2007.

OLIVEIRA, N. C. S. **Análise proteômica comparativa do carcinoma mamário lobular e ductal**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/26266/Dissertacao%20-%20Nayara%20Oliveira.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2012.

OMS: Organização Mundial De Saúde. Disponível em <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: fevereiro de 2013.

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.

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

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **A Cancer Journal of Clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; CHENDRAUI, P.; HAYA, J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 1, p. 7-19, 2009.

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

QIN, Z., KREPLAK, L., BUEHLER, M. J. Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0007294>> Acesso em: dezembro de 2012.

RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S. Functional characterization of acetylated Brazil nut (*Bertholletia excels* HBK) kernel globulin. **Ciência Tecnologia Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 134-138, 2004.

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

RONNOV-JENSEN, L.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiological Reviews**, v. 76, n. 1, p. 69-125, 1996.

RUSSO, J.; CALAF, G.; ROI, L.; RUSSO, I. H. Influence of age and gland topography on cell kinetics of normal human breast tissue. **J Natl Cancer Inst**, v. 78, p. 413–418, 1987.

RUSSO, J.; RUSSO, I. R. Development of the human breast. **Maturitas**, v. 49, p. 2-15, 2004.

SMALLEY, M.; ASHWORTH, A. Stem cells and breast cancer: A fields in transit. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 11, p. 832-844, 2003.

SILBERSTEIN, G. B. Tumour–stromal interactions: Role of the stroma in mammary development. **Breast Cancer Research**, v. 3, p. 218-223, 2001.

SILVERI, L.; TILLY, G.; VILOTTE, J.; PROVOST, F. Le. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 5, p. 549-556, 2006.

SOMIARI, R. I.; SOMIARI, S.; RUSSELL, S.; SHRIVER, C. D. Proteomics of breast carcinoma. **Journal of Chromatography B**. v. 815, n. 1/2, p. 215-225, 2005.

SRINIVAS, P. R. Proteomics for cancer biomarker discovery. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1160-1169, 2002.

STERNLICHT, M. D.; SUNNARBORG, S. W.; KOUROS-MEHR, H.; YU, Y.; LEE, D. C.; WERB, Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. **Development**, v. 132, p. 3923-3933, 2005.

STERNLICHT, M. D. Key stages in mammary gland development – The cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 1, 2006.

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.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat Res**, v. 402, n. 1-2, p. 7-14, 1998.

TAVASSOLI, F. A. Atypical hyperplasia: a morphologic risk factor for subsequent development of invasive breast carcinoma. **Cancer Invest**, v. 10, n. 5, p.433-441, 1992.

TLSTY, T. D.; CRAWFORD, Y. G.; HOLST, C. R.; FORDYCE, C. A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M. L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 263-274, 2004.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIÈRE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; LE BOURHIS, X. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 1239-1247, 2007.

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, n. 6, p. 2319-2323, 1990.

UNIPROT. Universal Protein Resource. Disponível em <<http://www.uniprot.org/>> Acesso em: janeiro de 2013.

VAN GENT, D.; SHARP, P.; MORGAN, K.; KALSHEKER, N. Serpins: structure, function and molecular evolution. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 11, p 1536-1547, 2003.

VAN'T VEER, L.J.; DAI, H.; VAN DE VIIVER, M.J.; HE, Y. D.; HART, A. A.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER KOOY, K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 417, n. 6871, p. 530-536, 2002.

VISVADER, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 23, p. 2563-2577, 2009.

WASSEL, J. Haptoglobin: function and polymorphism. **Clinical Laboratory**, v. 46, p. 547-552, 2000.

WATSON, C. J. Post-lactational mammary gland regression:molecular basis and implications for breast cancer. *Expert Rev Mol Med*, v. 8, n. 32, p. 1-15, 2006.

WEINBERG, R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, v. 230, p. 770-776, 1985.

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

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 247-299, 2005.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830-838, 1996.

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

World Health Organization (WHO). WHO Cancer Control Programme. Disponível em <www.who.int/cancer/en/> Acesso em: dezembro de 2012.

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

WULFKUHLE, J. D.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews – Cancer**, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2003.

YAMAZAKI, D.; KURISU, S.; TAKENAWA, T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. **Cancer Sci**, v. 96, n. 7, p. 379-386, 2005.

YANG, X.; HU, Y.; YIN, D. H.; TURNER, M. A.; WANG, M.; BORCHARDT, R. T.; HOWELL, P. L.; KUCZERA, K.; SCHOWEN, R. L. Catalytic strategy of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: transition-state stabilization and the avoidance of abortive reactions. **Biochemistry**, v. 42, p. 1900-1909, 2003.

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

ZHAO, Z.; LEE, C. C.; JIRALERSPONG, S.; JUYAL, R. C.; LU, F.; BALDINI, A.; GREENBERG, F.; CASKEY, C. T.; PATEL, P. I. The gene for a human microfibril-associated glycoprotein is commonly deleted in Smith-Magenis syndrome patients. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 4, p. 589-597, 1995.

ZHU, K.; ZHAO, J.; LUBMAN, D. M.; MILLER, F. R.; BARDER, T. J. Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 2745-2755, 2005.

ANEXO

ANEXO 1 Interface da plataforma MASCOT 96

ANEXO 1 – Interface da plataforma MASCOT

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name **Email**

Search title

Database(s)
 NCBInr
 contaminants
 cRAP

Enzyme

Allow up to missed cleavages

Taxonomy

Fixed modifications

Phospho (ST)
 Phospho (Y)
 Propionamide (C)
 Pyridylethyl (C)
 Pyro-carbamidomethyl (N-term C)
 Sulfo (STY)
 TMT2plex (K)
 TMT2plex (N-term)
 TMT6plex (K)
 TMT6plex (N-term)

Display all modifications

Variable modifications

Protein mass kDa **Peptide tol. ±**

Mass values MH⁺ M_r M-H⁻ **Monoisotopic** Average

Data file peaklist.xml

Query
 NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.

Decoy **Report top** hits